

Том 54, № 4, 2024  
Vol. 54, № 4, 2024

ISSN 2074-9414  
ISSN 2313-1748

# ТЕХНИКА И ТЕХНОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Food Processing:  
Techniques and Technology



18

Кемеровский  
государственный  
университет  
Объединяем  
знания и людей

*Food Processing: Techniques and Technology* is an open access, double-blind peer-reviewed quarterly journal that encompasses a wide range in the food industry and agricultural science in Russia and neighboring regions.

The Journal is accepted by SCOPUS and Russian Science Citation Index. Our open access policy follows the Budapest Open Access Initiative (BOAI).

The Journal's mission is to present, integrate and disseminate the most important results of fundamental and applied research in the food industry of Russia and the CIS countries. We aim to create scientific content that would reflect the current state of food science.

The Journal is addressed to practicing professionals, scientists, academics, and students.

The Journal publishes scientific articles, reviews, and research briefs in the following areas: food systems; biotechnology; food production technology; sanitation and health; ecology; biosecurity; zootechnics; electro-technologies, agro-industrial machines and equipment. For submission instructions, subscription and all other information visit this journal online at [fptt.ru/en](http://fptt.ru/en)

---

#### Editor-in-Chief

**Alexander Yu. Prosekov**, Corresponding Member of the RAS, Dr. Sci. (Eng.), Dr. Sci. (Biol.), Kemerovo State University, Kemerovo, Russia.

#### Deputy Editor-in-Chief

**Andrey N. Petrov**, Academician of the RAS, Dr. Sci. (Eng.), All-Russia Dairy Research Institute, Moscow, Russia;

**Olga O. Babich**, Dr. Sci. (Eng.), Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia.

#### Editorial Board Member

**Evgeny V. Abakumov**, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biol.), St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;

**Igor V. Altukhov**, Dr. Sci. (Eng.), Industrial Technological Innovations LLC, Irkutsk, Russia;

**Vladimir V. Bakharev**, Dr. Sci. (Chem.), Samara State Technical University, Samara, Russia;

**Svetlana M. Bychkova**, Dr. Sci. (Econ.), St. Petersburg State Agrarian University, Pushkin, Russia;

**Aram G. Galstyan**, Academician of the RAS, Dr. Sci. (Eng.), All-Russia Dairy Research Institute, Moscow, Russia;

**Irina A. Ganieva**, Dr. Sci. (Econ.), Research and Academic Centre "Kuzbass", Kemerovo, Russia;

**Ivan F. Gorlov**, Academician of the RAS, Dr. Sci. (Agr.), Povolzhsky Research Institute of Production and Processing of Meat and Dairy Products, Volgograd, Russia;

**Galina M. Gritsenko**, Dr. Sci. (Econ.), Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Technologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Russia;

**Nina I. Dunchenko**, Dr. Sci. (Eng.), Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;

**Ivan A. Evdokimov**, Corresponding Member of the RAS, Dr. Sci. (Eng.), North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia;

**Alexandra V. Zaushitsena**, Dr. Sci. (Biol.), Kemerovo State University, Kemerovo, Russia;

**Yujun Jiang**, Ph.D., College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin, China;

**Anatoly P. Kaledin**, Dr. Sci. (Biol.), Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;

**Anna B. Kapranova**, Dr. Sci. (Econ.), Yaroslavl State Technical University, Yaroslavl, Russia;

**Nikolay I. Kashevarov**, Academician of the RAS, Dr. Sci. (Agr.), Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Bio Technologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Russia;

**Vladimir G. Lobanov**, Dr. Sci. (Eng.), Kuban State Technological University, Krasnodar, Russia;

**Gazibeg O. Magomedov**, Dr. Sci. (Eng.), Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia;

**Olga A. Neverova**, Dr. Sci. (Biol.), Kemerovo State University, Kemerovo, Russia;

**Sergei L. Tikhonov**, Dr. Sci. (Eng.), Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia;

**Olga A. Frolova**, Dr. Sci. (Econ.), Nizhni Novgorod Engineering-economic State University, Knyaginino, Russia;

**Gayrat Sh. Haydarov**, PhD (Eng.), Uzbek-Finnish Pedagogical Institute, Samarqand, Uzbekistan;

**Vladimir N. Khmelev**, Dr. Sci. (Eng.), Biysk Technological Institute, Altai State Technical University, Biysk, Russia;

**Yuri S. Khotimchenko**, Dr. Sci. (Biol.), Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia;

**Sergey V. Shakhov**, Dr. Sci. (Eng.), Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia;

**Igor V. Yudaev**, Dr. Sci. (Eng.), Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russia.

---

All articles are licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Executive Editor: A.I. Loseva

Publishing Editor: A.A. Kiryakova

Editor and Proofreader: F.I. Zakharina

English Editor: N.V. Rabkina

Computer layout design: E.V. Volkova

Website Editor: E.V. Dmitrieva

*Founder, Publisher and Editorial:* Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, Kemerovo region – Kuzbass, 650000, Russia  
phone: +7(3842) 58-80-24  
e-mail: [fptt98@gmail.com](mailto:fptt98@gmail.com)

*Printing Office:* Kemerovo State University, 73, Sovetskiy Ave., Kemerovo, Kemerovo region – Kuzbass, 650000, Russia

Date of issue December 24, 2024

Printed sheet 30.92 conventional printed  
Circulation 500 cop.

Open price. Issued 4 times a year

Full-texts are available online at [fptt.ru/en](http://fptt.ru/en),  
[elibrary.ru](http://elibrary.ru), [e.lanbook.com](http://e.lanbook.com), [cyberleninka.ru](http://cyberleninka.ru)

© 2024, Kemerovo State University

Национальный, рецензируемый научный журнал, посвященный вопросам пищевой промышленности и смежных отраслей. Журнал включен в SCOPUS, RSCI, Перечень ВАК (категория К1).

Миссия: создание, агрегация, поддержка и распространение научно-образовательного контента в области пищевой промышленности, объединение усилий различных категорий исследователей, вузовской и научной

интеллектуальной, преодоление разрыва между изданиями регионального, национального и федерального уровней. Журнал призван освещать актуальные проблемы в пищевой и смежных отраслях, продвигать новые перспективные технологии в широкую аудиторию научных и практических работников, преподавателей, аспирантов, студентов, предпринимателей, а также оказывать содействие в подготовке высококвалифицированных специалистов.

В журнале публикуются научные и обзорные статьи, краткие научные сообщения по направлениям: пищевые системы; биотехнология; технология пищевых производств; санитария и гигиена; экология; биобезопасность; частная зоотехния; электротехнологии, машины и оборудование для агропромышленного комплекса. Подробная информация для авторов и читателей представлена на сайте <https://fptt.ru>

*Главный редактор:*

**А.Ю. Просек**, член-корр. РАН, д-р техн. наук, д-р биол. наук, Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия.

*Зам. главного редактора:*

**А.Н. Петров**, академик РАН, д-р техн. наук, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия;

**О.О. Бабич**, д-р техн. наук, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия.

*Редакционная коллегия:*

**Е.В. Абакумов**, профессор РАН, д-р биол. наук, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**И.В. Алтухов**, д-р техн. наук, ООО «Промышленные технологические инновации», Иркутск, Россия;

**В.В. Бахарев**, д-р хим. наук, Самарский государственный технический университет, Самара, Россия;

**С.М. Бычкова**, д-р экон. наук, Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Пушкин, Россия;

**А.Г. Галстян**, академик РАН, д-р техн. наук, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия;

**И.А. Ганиева**, д-р экон. наук, АНО «Научно-образовательный центр «Кузбасс», Кемерово, Россия;

**И.Ф. Горлов**, академик РАН, д-р с.-х. наук, Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции, Волгоград, Россия;

**Г.М. Гриценко**, д-р экон. наук, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Краснообск, Россия;

**Н.И. Дунченко**, д-р техн. наук, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия;

**И.А. Евдокимов**, член-корр. РАН, д-р техн. наук, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия;

**А.В. Заушинцева**, д-р биол. наук, Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия;

**Ю. Йианг**, Ph. D., Колледж пищевых наук Северо-Восточного сельскохозяйственного университета, Харбин, Китай;

**А.П. Каледин**, д-р биол. наук, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия;

**А.Б. Капранова**, д-р физ.-мат. наук, Ярославский государственный технический университет, Ярославль, Россия;

**Н.И. Кашеваров**, академик РАН, д-р с.-х. наук, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Краснообск, Россия;

**В.Г. Лобанов**, д-р техн. наук, Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия;

**Г.О. Магомедов**, д-р техн. наук, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия;

**О.А. Неверова**, д-р биол. наук, Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия;

**С.Л. Тихонов**, д-р техн. наук, Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия;

**О.А. Фролова**, д-р экон. наук, Нижегородский государственный инженерно-экономический университет, Княгинино, Россия;

**Г.Ш. Хайдаров**, канд. техн. наук, Узбекско-Финский педагогический институт, Самарканд, Узбекистан;

**В.Н. Хмелев**, д-р техн. наук, Бийский технологический институт Алтайского государственного технического университета, Бийск, Россия;

**Ю.С. Хотимченко**, д-р биол. наук, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия;

**С.В. Шахов**, д-р техн. наук, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия;

**И.В. Юдаев**, д-р техн. наук, Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия.

Материалы публикуются на условиях лицензии CC BY 4.0.

Выпускающий редактор: А.И. Лосева

Ответственный за выпуск: А.А. Кирякова

Литературный редактор: Ф.И. Захарина

Литературный редактор (англ. язык): Н.В. Рабкина

Дизайн и компьютерная верстка: Е.В. Волкова

Редактор онлайн версии: Е.В. Дмитриева

*Учредитель, издатель и редакция:* Кемеровский государственный университет, 650000, Россия, Кемеровская обл. – Кузбасс, г. Кемерово, Красная, 6  
тел.: +7 (3842) 58-80-24  
e-mail: [fptt98@gmail.com](mailto:fptt98@gmail.com)

*Адрес типографии:* Кемеровский государственный университет, 650000, Россия, Кемеровская обл. – Кузбасс, г. Кемерово, пр. Советский, 73

Дата выхода в свет 24.12.24

Усл. п. л. 30,92. Тираж 500 экз.

Цена свободная. Выходит 4 раза в год

Подписной индекс по интернет-каталогу агентства «Урал-Пресс» – 41672

Регистрационный номер СМИ серия ПИ № ФС77-72313 выдано Роскомнадзор

© Кемеровский государственный университет, 2024.

Колонка главного редактора  
<https://fptt.ru>

Молочная промышленность занимает важное место в продовольственной безопасности России, обеспечивая население высококачественными и полноценными продуктами питания. Несмотря на современные вызовы, российская молочная отрасль продолжает развиваться. Растут производство и потребление молока и молочных продуктов, увеличивается экспорт и открываются новые внешние рынки. По прогнозам Национального союза производителей молока, в 2024 г. объем производства товарного молока в РФ составит 26,3 млн тонн (в 2023 г. – 25,8 млн тонн), потребление – 32,9 млн тонн (в 2023 г. – 31,3 млн тонн), объем импорта – 7,3 млн тонн (в 2023 г. – 6,4 млн тонн). При этом экспорт молочной продукции из РФ в 2024 г. увеличится до 1,1 млн тонн (в 2023 г. – 1 млн тонн).

Деятельность Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ), отмечающего в 2024 г. 95-летие со дня основания, существенно повлияла на развитие молочной отрасли России. ВНИМИ является ведущим центром фундаментальных и прикладных исследований в области переработки молока и производства молочных продуктов. Деятельность института охватывает широкий спектр задач: от разработки новых методов переработки молока до создания технологий, способствующих улучшению качества и безопасности молочной продукции. ВНИМИ способствует популяризации научных достижений и внедрению новых технологий в промышленность. Институт активно сотрудничает с отечественными и международными научными центрами, что позволяет обмениваться знаниями и опытом в области молочного дела.

Авторитет и успех ВНИМИ – заслуга его выдающихся ученых и руководителей, преданных молочному делу. В разное время директорами института были Л. А. Вишеров, Н. В. Зененко, В. И. Сирик, Н. Я. Лукьянов, Я. И. Костин. Неоценимый вклад в развитие института внес заслуженный деятель науки и техники РФ, доктор технических наук, профессор, академик РАСХН Николай Никитович Липатов. Он руководил институтом в 1965–1978 гг. В это время ВНИМИ стал общепризнанным и ведущим центром научного обеспечения молочной отрасли. Уровень научных исследований ученых института вышел на передовые линии научно-технического прогресса как в фундаментальном плане, так и в части решения важнейших прикладных задач молочной отрасли. Академик Н. Н. Липатов создал в институте эффективную систему подготовки аспирантов, сформировал коллектив единомышленников, налажил сотрудничество с ведущими учеными и руководителями других отраслевых НИИ и вузов. Николай Никитович внес весомый вклад в развитие теории сепарирования и создание новых типов саморазгружающихся, комбинированных и многосекционных сепараторов. Он

Ректор, главный редактор,  
член-корр. РАН, профессор,  
Заслуженный работник высшей школы РФ,  
Лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники

по праву считается основоположником теории непрерывных методов производства творога на основе коагуляции белков молока в потоке, на основе которой создано серийное высокопроизводительное автоматизированное оборудование для выпуска этого продукта, не имеющее аналогов в мировой практике.

С 1994–2013 гг. директором ВНИМИ был не менее известный ученый – лауреат премии Правительства РФ, заслуженный деятель науки и техники РФ, доктор технических наук, профессор, академик РАСХН Владимир Дмитриевич Харитонов. Он занимался разработкой и созданием новых технологий и процессов производства сухих молочных и белковых продуктов. Под руководством академика В. Д. Харитонova специалистами ВНИМИ разработаны и внедрены новые способы переработки и обработки молока-сырья и молочных продуктов с использованием процессов бактофугирования, микрофльтрации, УФ-обработки, виброкавитационного воздействия и др. Впервые в России была реализована промышленная технология производства микрофильтрованного молока, творога, сывороточных напитков и концентрата молочных белков с использованием мембранных технологий. Применение разработанных способов микрофльтрации в производстве новых продуктов позволило существенно увеличить сроки их годности без ужесточения тепловых режимов обработки.

С 2019 г. ВНИМИ возглавляет Арам Генрихович Галстян, академик РАН, профессор, доктор технических наук, лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники. Арам Генрихович является экспертом в области процессов и технологий производства и переработки пищевых продуктов, а также в разработке методов их качественного анализа. Под его руководством ВНИМИ продолжает укреплять свой авторитет головной отраслевой научной организации и помогает эффективно решать задачи, стоящие перед российской молочной отраслью.

95 лет назад ВНИМИ был создан с целью улучшения качества молочной продукции и обеспечения ее доступности для населения нашей огромной страны. И за это время многое изменилось, однако высокая планка качества и стремление к инновациям остаются неизменными. Сегодня институт продолжает свою миссию, совмещая научные исследования с практическими применениями.

Редакция журнала сердечно поздравляет Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности в лице его директора, академика А. Г. Галстяна с 95-летием! Желаем всему коллективу новых идей и открытий, успешной реализации проектов и решения приоритетных задач для развития и укрепления молочной отрасли России! Желаем Вам и Вашим родным здоровья, благополучия, добра и счастья, оптимизма и уверенности в завтрашнем дне!

А. Ю. Просеков 

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2533>  
<https://elibrary.ru/SETXHC>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Биосинтез лактулозы с использованием ферментов лактозосбраживающих микромицет и бактерий



С. А. Рябцева\*<sup>ORCID</sup>, М. А. Шпак<sup>ORCID</sup>, А. Д. Лодыгин<sup>ORCID</sup>, А. В. Серов<sup>ORCID</sup>,  
С. Н. Сазанова<sup>ORCID</sup>, М. В. Скороходова<sup>ORCID</sup>, В. Ю. Ромахова<sup>ORCID</sup>

Северо-Кавказский федеральный университет<sup>ORCID</sup>, Ставрополь, Россия

Поступила в редакцию: 14.03.2024  
Принята после рецензирования: 16.04.2024  
Принята к публикации: 07.05.2024

\*С. А. Рябцева: [ryabtseva07@mail.ru](mailto:ryabtseva07@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>  
М. А. Шпак: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>  
А. Д. Лодыгин: <https://orcid.org/0000-0001-8460-2954>  
А. В. Серов: <https://orcid.org/0000-0002-2581-556X>  
С. Н. Сазанова: <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007>  
М. В. Скороходова: <https://orcid.org/0009-0009-9593-6074>  
В. Ю. Ромахова: <https://orcid.org/0009-0000-1066-4394>

© С. А. Рябцева, М. А. Шпак, А. Д. Лодыгин, А. В. Серов,  
С. Н. Сазанова, М. В. Скороходова, В. Ю. Ромахова, 2024



### Аннотация.

Лактулоза относится к хорошо изученным пребиотикам и давно используется в медицине и пищевой промышленности. Альтернативой традиционным химическим способам является получение лактулозы с применением бета-галактозидаз. Целью работы было исследование процессов биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидаз, полученных при раздельном и совместном культивировании лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий в пермеате молочной сыворотки.

В качестве продуцентов бета-галактозидаз использовали штаммы лактозосбраживающих дрожжей *Kluyveromyces lactis* ВКМ Y-1333 и Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y-459 и Y-1338, а также вязкие расы молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* БК-Углич-АВ и *Streptococcus thermophilus* БК-Углич-ТВ. Определение активности  $\beta$ -галактозидазы было основано на гидролизе о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозиды. Определение углеводного состава проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографией на хроматографе SHIMADZU LC-20 Prominence.

К общим закономерностям образования лактулозы при использовании ферментов исследованных дрожжей можно отнести быстрый рост ее концентрации в течение первых 30 мин реакции с последующим снижением или стабилизацией. Активность некоторых комбинированных неочищенных ферментных препаратов дрожжей и молочнокислых микроорганизмов существенно превышает активность бета-галактозидаз продуцентов после их раздельного культивирования. Закономерности образования лактулозы зависят как от штамма дрожжей, так и от вида молочнокислых бактерий. Самые высокие выходы лактулозы были получены при использовании комбинированных  $\beta$ -галактозидаз всех исследованных штаммов дрожжей с вязкими расами *S. thermophilus*.

Совместное культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий в некоторых сочетаниях позволило получить комбинированные неочищенные ферментные препараты с более высокой активностью и более высокие выходы лактулозы, чем отдельное культивирование дрожжей. Данные результаты могут быть использованы для получения очищенных ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидаз и лактулозосодержащих продуктов из вторичного молочного сырья.

**Ключевые слова.** Лактулоза, лактоза, трансгликозилирование,  $\beta$ -галактозидазы, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме: «Создание первого в России высокотехнологичного производства пребиотика лактулозы и функциональных молочных ингредиентов для импортозамещения в медицине, ветеринарии, детском питании, производстве лечебно-профилактических продуктов для людей и животных» (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства № 075-11-2022-021 от 07.04.2022 г.) в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет<sup>ORCID</sup>».

**Для цитирования:** Биосинтез лактулозы с использованием ферментов лактозосбраживающих микромицет и бактерий / С. А. Рябцева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 645–657. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2533>

## Lactulose Biosynthesis with Enzymes of Lactose-Fermenting Micromycetes and Bacteria



Svetlana A. Ryabtseva\*<sup>ORCID</sup>, Maria A. Shpack<sup>ORCID</sup>,  
Aleksii D. Lodygin<sup>ORCID</sup>, Alexander V. Serov<sup>ORCID</sup>, Serafima N. Sazanova<sup>ORCID</sup>,  
Marina V. Skorokhodova<sup>ORCID</sup>, Vera Yu. Romakhova<sup>ORCID</sup>

North-Caucasus Federal University<sup>ORCID</sup>, Stavropol, Russia

Received: 14.03.2024

Revised: 16.04.2024

Accepted: 07.05.2024

\*Svetlana A. Ryabtseva: [ryabtseva07@mail.ru](mailto:ryabtseva07@mail.ru),

<https://orcid.org/0000-0001-9803-8709>

Maria A. Shpack: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9061>

Aleksii D. Lodygin: <https://orcid.org/0000-0001-8460-2954>

Alexandr V. Serov: <https://orcid.org/0000-0002-2581-556X>

Serafima N. Sazanova: <https://orcid.org/0000-0002-8200-3007> Marina V.

Skorokhodova: <https://orcid.org/0009-0009-9593-6074>

Vera Yu. Romakhova: <https://orcid.org/0009-0000-1066-439>

© S.A. Ryabtseva, M.A. Shpack, A.D. Lodygin, A.V. Serov, S.N. Sazanova,  
M.V. Skorokhodova, V.Yu. Romakhova, 2024



### Abstract.

Lactulose is a well-studied prebiotic popular in medicine and the food industry.  $\beta$ -Galactosidases offer an alternative to traditional chemical methods of lactulose production. The article describes lactulose biosynthesis with crude enzyme preparations of  $\beta$ -galactosidases obtained by separate and joint cultivation of lactose-fermenting yeasts and lactic acid bacteria in whey permeate. The research featured the following producers of  $\beta$ -galactosidases: lactose-fermenting yeasts of *Kluyveromyces lactis* VKM Y-1333 and Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* VKM Y-459 and Y-1338, and viscous strains of lactic acid bacteria of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus*. The  $\beta$ -galactosidase activity was measured using the method of o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside hydrolysis. The method of high-performance liquid chromatography made it possible to reveal the carbohydrate composition.

The lactulose formation by yeast enzymes demonstrated the following pattern: its concentration increased rapidly during the first 30 min of reaction with subsequent decrease or stabilization. Some combined unpurified enzyme preparations of yeasts and lactic acid microorganisms were more active than  $\beta$ -galactosidases obtained by separate cultivation. The patterns of lactulose formation depended on both the yeast strain and the type of lactic acid bacteria. The highest yields of lactulose belonged to the samples that combined  $\beta$ -galactosidases of all yeast strains with *Streptococcus thermophilus*.

Co-cultivation of yeast and lactic acid bacteria in some combinations produced combined crude enzyme preparations with higher activity and greater lactulose yields than separate yeast cultivation. These results can help to obtain purified enzyme preparations of  $\beta$ -galactosidases and lactulose-containing products from secondary dairy raw materials.

**Keywords.** Lactulose, lactose, transglycosylation,  $\beta$ -galactosidases, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*

**Funding.** The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a comprehensive high-tech project of First Russian high-tech lactulose prebiotic and functional dairy ingredients for import substitution in medicine, veterinary practice, baby food, and medical preventive products for humans and animals (Agreement No. 075-11-2022-021, April 7, 2022, on federal budget subsidies for cooperation between state scientific institutions and the real sector of the economy in the sphere of high-tech production); Decree No. 218, April 9, 2010, of the Government of the Russian Federation to the North Caucasian Federal University<sup>ORCID</sup>.

**For citation:** Ryabtseva SA, Shpack MA, Lodygin AD, Serov AV, Sazanova SN, Skorokhodova MV, et al. Lactulose Biosynthesis with Enzymes of Lactose-Fermenting Micromycetes and Bacteria. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):645–657. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2533>

### Введение

Среди множества стратегий преобразования лактозы в продукты с добавленной стоимостью выделяется ее использование в качестве сырья для производства

биологически активных соединений. Среди таких соединений особую ценность приобретают пребиотики, которые способны стимулировать рост полезной для здоровья микрофлоры. Благодаря этому они стали

важными компонентами функциональных пищевых продуктов. К активным и хорошо изученным пребиотикам относятся галактоолигосахариды и лактулоза (производные лактозы), которые могут быть получены из побочного молочного сырья. Это соответствует мировым тенденциям формирования устойчивой экономики замкнутого цикла [1].

Лактулоза – изомер лактозы – используется более 60 лет в медицине для лечения печеночной энцефалопатии и хронических запоров и обладает активными пребиотическими свойствами. Лактулозу рассматривают как многофункциональный пищевой ингредиент и применяют в молочной, кондитерской, хлебобулочной и других отраслях пищевой промышленности [2]. В нашей стране спрос на лактулозу пока удовлетворяют иностранные фирмы, поэтому задача организации ее отечественного производства остается актуальной [3].

Получение лактулозы в промышленных масштабах основано на LA-трансформации лактозы, которая катализируется щелочными реагентами. К недостаткам таких способов относится необходимость удаления побочных продуктов реакции и катализаторов, а также сложность выделения лактулозы из смеси углеводов [4, 5]. Альтернативой являются ферментативные способы синтеза лактулозы, которые считаются экологически чистыми и позволяют проводить процессы в более мягких условиях. Еще одно преимущество биотехнологии лактулозы – это возможность использования в качестве источников лактозы вторичного молочного сырья, в т. ч. пермеатов молочной сыворотки [5, 6]. Все это соответствует современным требованиям к экологически безопасным технологиям и натуральным продуктам [7, 8].

Для биоконверсии лактозы в лактулозу существует два основных пути: прямой и с промежуточным гидролизом. Для первого необходима изомераза, которая бы трансформировала глюкозный остаток лактозы во фруктозный, но такой фермент пока не найден. Подобную реакцию могут катализировать целлюлозо-2-эпимеразы некоторых микроорганизмов, безопасность которых пока не подтверждена. Второй путь предполагает применение класса гидролаз, которые сначала расщепляют лактозу до галактозы и глюкозы, а затем могут присоединять галактозный остаток к фруктозе (т. е. проводить трансгалактозилирование). Такими свойствами обладают  $\beta$ -галактозидазы, в т. ч. имеющие международный статус безопасности, промышленное производство которых организовано в значительных объемах [5, 6, 8]. В связи с этим второй путь ферментативного синтеза лактулозы привлекает внимание ученых уже более 20 лет и сохраняет свою актуальность [9].

Проведенный ранее анализ литературы показал, что микромицеты (дрожжи рода *Kluyveromyces* и плесени рода *Aspergillus*) относятся к основным продуцентам  $\beta$ -галактозидаз для получения лактулозы. При этом результаты реакции существенно отличаются при использовании разных ферментов и условий ее проведе-

ния. Максимальный выход лактулозы в случае применения  $\beta$ -галактозидаз *Kluyveromyces lactis* варьировал в диапазоне от 4 до 28 %, *Aspergillus oryzae* – от 1,7 до 60 % [9]. Именно лактозосбраживающие аскомицеты *K. lactis*, как наиболее безопасные продуценты, обычно используют для промышленного производства лактаз пищевого назначения [10]. Анализ литературы показал, что дрожжевые  $\beta$ -галактозидазы позволяют проводить биосинтез лактулозы при более низких значениях соотношения молярных концентраций фруктозы и лактозы, чем ферменты из плесеней. Это более выгодно с экономической точки зрения, т. к. добавление фруктозы приводит к повышению стоимости затрат на сырье и процессы выделения лактулозы из реакционной смеси. Для снижения себестоимости производства лактулозы целесообразно также использовать в качестве источника лактозы побочное молочное сырье, в т. ч. пермеат молочной сыворотки, а также неочищенные ферментные препараты [9].

Данные об условиях процессов, при которых были получены максимальные концентрации лактулозы, в литературе широко варьируются и не всегда совпадают с оптимальными для данного вида ферментов. Например, биосинтез лактулозы с  $\beta$ -галактозидазами *K. lactis* (оптимум pH 7,0, температуры 50 °С) проводили в диапазоне pH от 6,0 до 7,5 при температурах от 6 до 60 °С, время реакции составляло от нескольких минут до нескольких суток [10]. В большинстве случаев использовали дорогостоящие ферменты зарубежного производства [9].

Учитывая необходимость обеспечения технологического суверенитета, можно считать актуальным исследование процессов получения  $\beta$ -галактозидаз отечественных коллекционных культур-продуцентов и их применения для биосинтеза лактулозы и других пребиотиков в рамках единого технологического цикла. Всероссийская коллекция микроорганизмов насчитывает большое количество штаммов лактозосбраживающих дрожжей, которые всесторонне, в т. ч. на генетическом уровне, изучены учеными [11, 12]. Обнаружено, что некоторые штаммы *Kluyveromyces marxianus* превосходили *K. lactis* по скорости ферментации растворов лактозы [13]. Также подтверждено, что межштаммовая гибридизация дрожжей является перспективным методом повышения активности ферментов [13].

К лактозосбраживающим микроорганизмам относятся не только дрожжи, но и молочнокислые бактерии. Поэтому выделение и применение их  $\beta$ -галактозидаз, в т. ч. для получения галактоолигосахаридов и лактулозы, привлекает внимание исследователей разных стран [14–17]. Данные бактерии могут вырабатывать метаболиты, стимулирующие или подавляющие рост дрожжей [18]. Совместное культивирование продуцентов разных по свойствам  $\beta$ -галактозидаз может повлиять как на гидролитическую, так и на трансгликозилирующую активность этих ферментов. Зарубежные

исследователи показали, что применение некоторых сочетаний коммерческих  $\beta$ -галактозидаз привело к существенному увеличению выхода галактоолигосахаридов, которые также являются продуктами трансгликозилирования лактозы [19].

Целью работы являлось исследование процессов биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидаз, полученных при раздельном и совместном культивировании лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий в пермеате молочной сыворотки.

#### Объекты и методы исследования

В качестве продуцентов бета-галактозидаз использовали штаммы лактозосбраживающих дрожжей *Kluyveromyces lactis* ВКМ У-1333 и У-1339, *Kluyveromyces marxianus* ВКМ У-459 и У-1338 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук», г. Пушкино), а также молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* (концентрат вязких рас ацидофильной палочки БК-Углич-АВ, оптимальная температура 37–38 °С) и *Streptococcus thermophilus* (концентрат вязких рас термофильного стрептококка БК-Углич-ТВ, оптимальная температура 40–45 °С) производства «Экспериментальная биофабрика» Россельхозакадемии, г. Углич. Для получения среды культивирования продуцентов и в качестве источника лактозы для биосинтеза лактулозы использовали сывороточный продукт сухой (пермеат), (Молочный комбинат «Воронежский», филиал «Калачеевский сырзавод») с массовой долей влаги 1,38 %, белка 3,44 %, золы 4,1 %, рН восстановленного продукта 6,5.

Объектами исследования выступали неочищенные ферментные препараты (в виде культуральной жидкости, содержащей  $\beta$ -галактозидазы, полученные из дрожжей или дрожжей и молочнокислых бактерий, а также ферментированные полученными неочищенными ферментными препаратами, растворы лактозы (источник – пермеат) и фруктозы (D (-) (производитель TATELYLE PLC (Великобритания), содержание основного вещества не менее 98 %).

Для получения неочищенных ферментных препаратов дрожжей сначала проводили их культивирование для накопления биомассы. Дрожжи активизировали путем пересева из коллекционных культур на плотную питательную среду Сабуро (Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, г. Углич, скошенный агар) и инкубации в течение 24 ч при оптимальной температуре 30 °С, после чего готовили суспензию клеток в фосфатном буфере с оптической плотностью  $D_{460} = 0,15 \pm 0,02$ , которая соответствовала концентрации клеток дрожжей  $\lg N = 5,4 \pm 0,2$ . Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр UNICO 2800 UV/VIS (UNITED PRODUCTS AND INSTRUMENTS, США). Для перемешивания суспензии использовали встряхиватель

медицинский вибрационный Vortex V – 3 (SIA «ELMI», Латвия). 1 см<sup>3</sup> полученной суспензии вносили в коническую колбу со 150 см<sup>3</sup> стерилизованного восстановленного УФ-пермеата с массовой долей сухих веществ 6,5 %, тщательно перемешивали и инкубировали в условиях аэрации в шейкер-инкубаторе ES 20/60 (SIA Biosan, Латвия) при температуре 30 °С и перемешивании 100 об/мин в течение 24 ч для накопления биомассы.

После этого проводили культивирование дрожжей в анаэробных условиях в инкубаторе с углекислой средой SANYO MCO-20AIC (AWTech, Япония) при температуре 30 °С, концентрации CO<sub>2</sub> 6 % в течение 24 ч для дополнительного накопления их биомассы и продуктов метаболизма, в т. ч. этилового спирта, который способствует пермеабилитации клеток и выделению ферментов. Далее полученные образцы подвергали тепловой обработке при 50 °С в течение 24 ч для разрушения клеток продуцентов бета-галактозидаз путем термоавтолиза и получения неочищенных ферментных препаратов. Определяли гидролитическую активность полученных неочищенных ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидаз (описание ниже).

Отличием экспериментов с использованием молочнокислых бактерий были дополнительные операции их активизации и их отдельного культивирования. Активизацию проводили в обезжиренном молоке в течение 24 ч при оптимальной температуре (37–38 °С для *L. acidophilus* и 40–45 °С для *S. thermophilus*), после чего 5 % полученной закваски вносили в стерилизованный восстановленный пермеат, тщательно перемешивали и инкубировали при оптимальной температуре в течение 24 ч для накопления биомассы. Параллельно дрожжи активизировали и культивировали в течение 24 ч аналогично вышеописанному. Затем проводили совместное культивирование, для чего ферментированный дрожжами пермеат смешивали в соотношении 1:1 с пермеатом, ферментированным молочнокислыми микроорганизмами, полученную смесь инкубировали в анаэробных условиях при вышеописанных режимах для дополнительного накопления их биомассы и продуктов метаболизма (спирта и молочной кислоты соответственно). Далее проводили термоавтолиз при вышеописанных режимах и определяли активность полученных неочищенных ферментных препаратов.

Затем проводили биосинтез лактулозы, для чего 5 см<sup>3</sup> каждого образца неочищенных ферментных препаратов смешивали с 5 см<sup>3</sup> субстрата, в качестве которого использовали водный 18 % (вес/объем) раствор лактозы и фруктозы с молярным соотношением 1:2 при рН =  $6,8 \pm 0,2$ . Полученные смеси термостатировали при 40 °С в течение 30 мин, 1 ч и 3 ч, после чего выдерживали 5 мин в кипящей водяной бане для инактивации фермента, охлаждали до  $20 \pm 22$  °С и замораживали. Полученные образцы анализировали на углеводный состав методом высокоэффективной жидкостной хроматографией (описание ниже).

Определение активности  $\beta$ -галактозидаз неочищенных ферментных препаратов проводили в соответствии с методикой, основанной на измерении интенсивности окраски о-нитрофенола, образующегося при гидролизе  $\beta$ -галактозидазой синтетического субстрата о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид [20]. К 50 мкл раствора  $\beta$ -галактозидазы (суспензии с клетками после термоавтолиза) добавляли 2 см<sup>3</sup> 1,25 мМ раствора ONPG в буфере (50 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 6,6–6,8), смесь инкубировали при температуре 37 °С в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,5 см<sup>3</sup> 1М раствора Na<sub>2</sub>СО<sub>3</sub>. Образующийся в ходе реакции о-нитрофенол имеет желтый цвет. Измерение оптической плотности полученной пробы проводили при длине волны 420 нм. Активность  $\beta$ -галактозидазы (А) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \times V}{\varepsilon \times t \times V_{\text{пр}}} \quad (1)$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора при 420 нм;  $\varepsilon$  – коэффициент молекулярной экстинкции о-нитрофенола, л/ммоль·см ( $\varepsilon = 4,5$ );  $t$  – время инкубации, мин;  $V$  – объем реакционной смеси, см<sup>3</sup>;  $V_{\text{пр}}$  – объем ферментного препарата, см<sup>3</sup>.

Определение углеводного состава проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографией на жидкостном хроматографе SHIMADZU LC-20 Prominence (SHIMADZU, Япония), снабженным рефрактометрическим детектором RID-20А, использовали колонку CarboSep 87С 300\*7,8 mm. В качестве подвижной фазы применяли деионизованную воду, условия хроматографии: скорость потока 0,6 см<sup>3</sup>/мин, температура 85 °С. В анализируемых образцах осаждали жир и белок с использованием реагентов Каррез I и Каррез II, смесь выдерживали в течение 15 мин при комнатной температуре, затем отделяли осадок при центрифугировании в течение 15 мин при 8000 об/мин. Заключительное фильтрование проводили с помощью шприцевых фильтров (производство ALWSCI, диаметр 25 мм, гидрофильные PTFE, диаметр пор 0,22 мкм). Образцы были разбавлены деионизованной водой в 2 раза.

Для построения калибровочного графика использовали аналитические стандарты углеводов (лактоза – CAS № 63-42-3, лактулоза – CAS № 4618-18-2, глюкоза – CAS № 50-99-7, галактоза – CAS № 59-23-4, фруктоза – CAS № 17598-81-1, тагатоза – CAS № 87-81-0) с содержанием чистых веществ 99,9 % производства Sigma-ALDRICH. Для прослеживания линейной зависимости были приготовлены калибровочные растворы с концентрацией от 100 мг/л до 10 г/л. Приготовление всех реактивов, стандартов, проб производилось с использованием деионизованной воды 18,2 М $\Omega$ ·см, полученной с использованием прибора для получения особо чистой воды Hydrolab HLP 5UV. Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения SHIMADZU Lab Solutions, release 5.73. Согласно

паспортным данным и результатам исследований, порядок элюирования индивидуальных компонентов: лактоза, лактулоза, глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза, тагатоза.

Выход лактулозы ( $B_{\text{лл}}$ , %) рассчитывали по формуле:

$$B_{\text{лл}} = \frac{C_{\text{лл}}}{C_{\text{л0}}} \times 100 \quad (2)$$

где  $C_{\text{лл}}$  – концентрация лактулозы, мг/л;  $C_{\text{л0}}$  – исходная концентрация лактозы, мг/л.

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы было проведено исследование процессов биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидаз дрожжей. Результаты определения активности неочищенных ферментных препаратов и углеводного состава образцов после биосинтеза лактулозы с использованием неочищенных ферментных препаратов штаммов вида *Kluyveromyces marxianus* представлены на рисунке 1, *Kluyveromyces lactis* – на рисунке 2.

Анализ результатов показал, что к общим закономерностям образования лактулозы при использовании ферментов разных видов и штаммов дрожжей можно отнести быстрый рост ее концентрации в течение первых минут реакции. Результаты этого этапа процесса существенно отличалась для разных штаммов: минимальный выход лактулозы в субстрате через 3 мин ферментации (0,7 %) был получен в опытах с *K. marxianus* Y-1338, максимальный в 2,1 раза выше – с *K. lactis* Y-1339. Высокая скорость биосинтеза лактулозы на первых этапах реакции с последующим ее снижением была отмечена и в других работах, в т. ч. с применением очищенных ферментных препаратов [21–25].

В дальнейшем концентрация лактулозы изменялась по-разному. В опытах с *K. marxianus* Y-459 она продолжала расти, достигнув максимума (1,5 %) через 30 мин. После этого наблюдали снижение концентрации лактулозы, сначала быстрое (почти в 1,5 раза через 30 мин), затем медленное в последующие 2 ч. При использовании фермента из *K. marxianus* Y-1338 концентрация лактулозы медленно увеличивалась на протяжении всего опыта, но максимальное значение ее выхода через 3 ч ферментации не превышало 1 % и было сопоставимо с результатами, полученными к этому времени в опытах с *K. marxianus* Y-459. В случае применения *K. lactis* Y-1333 концентрация лактулозы продолжала увеличиваться в течение 60 мин, достигнув максимальных значений выхода 1,3 %, после чего снизилась почти в 2 раза за 2 ч. Другие закономерности изменения концентрации лактулозы установлены в опытах с *K. lactis* Y-1339: после достижения максимума в первые минуты реакции наблюдали ее незначительное снижение через 1 ч и дальнейшую стабилизацию выхода на уровне 1,4 % до конца опыта.

Данные экспериментов близки к результатам работы, проведенной с пермеабилizованными клетками

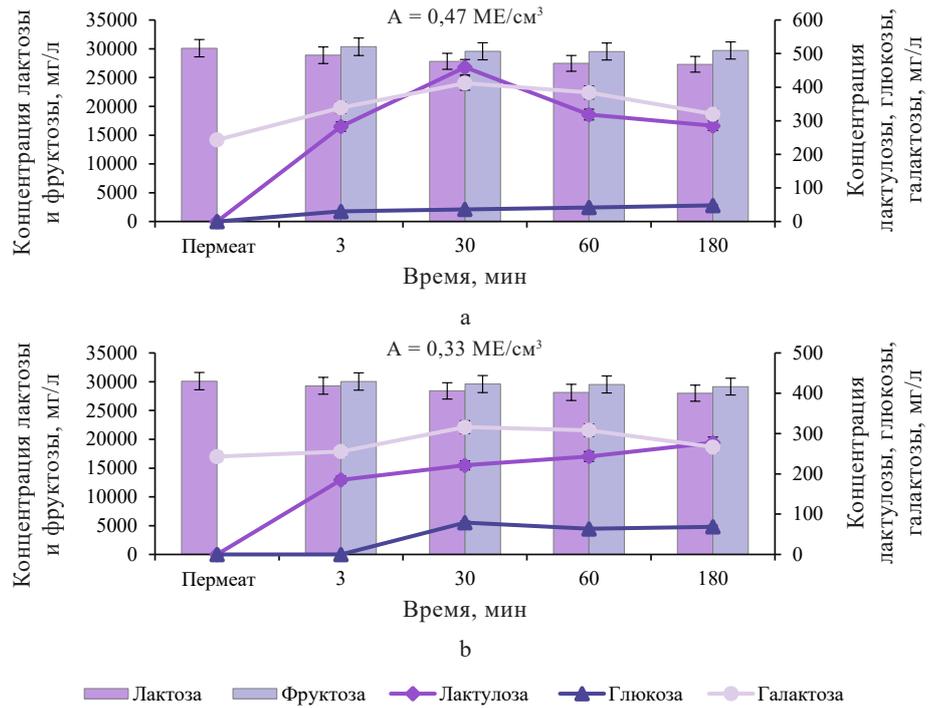


Рисунок 1. Влияние времени ферментации на углеводный состав образцов с использованием штаммов *Kluveromyces marxianus*: а – *Kluveromyces marxianus* Y-459; б – *Kluveromyces marxianus* Y-1338; А – активность бета-галактозидаз

Figure 1. Effect of fermentation time on carbohydrate composition with *Kluveromyces marxianus*: а – *Kluveromyces marxianus* Y-459; б – *Kluveromyces marxianus* Y-1338; А –  $\beta$ -galactosidase activity

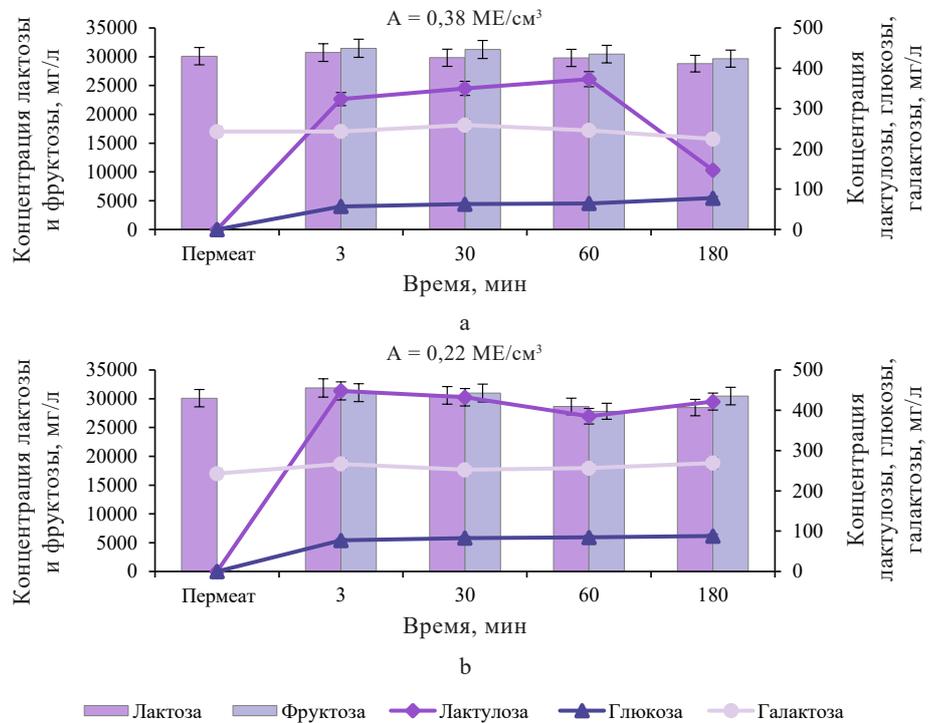


Рисунок 2. Влияние времени ферментации на углеводный состав образцов с использованием штаммов *Kluveromyces lactis*: а – *Kluveromyces lactis* Y-1333; б – *Kluveromyces lactis* Y-1339; А – активность бета-галактозидаз

Figure 2. Effect of fermentation time on carbohydrate composition with *Kluveromyces lactis*: а – *Kluveromyces lactis* Y-1333; б – *Kluveromyces lactis* Y-1339; А –  $\beta$ -galactosidase activity

*K. lactis* в близких условиях (при 40 °С, pH 7, молярном соотношении фруктозы к лактозе 2:1) [26]. Продуктивность по лактулозе составила 0,18–2 г/л·ч в зависимости от концентрации и обработки клеток дрожжей и времени (расчетные значения аналогичного показателя в опытах *K. marxianus* Y-459 составили 0,3–1 г/л·ч). Сопоставление с результатами других работ, в которых были получены более высокие выходы лактулозы [21–25], затруднено, т. к. при этом использовали другие условия проведения реакции, включая применение более высоких молярных соотношений концентраций фруктозы и лактозы, очищенных бета-галактозидаз, и/или иммобилизацию ферментов.

Полученные результаты соответствуют литературным данным о том, что процессы биосинтеза лактулозы являются сложными, они могут сопровождаться другими ферментативными реакциями и образованием разных углеводов [9]. Реакция трансгликозилирования включает 3 стадии: образование комплекса  $\beta$ -галактозидазы с лактозой; образование галактозильного комплекса с ферментом с высвобождением глюкозы; перенос галактозы к нуклеофильному акцептору, содержащему гидроксильную группу. Таким акцептором может быть вода, тогда галактоза выделяется в свободном виде. Если роль акцептора играет фруктоза, продуктом реакции становится лактулоза. Реакции, в которых ферменты класса гидролаз выполняют функцию псевдотрансфераз, считаются кинетически контролируемыми. Для них характерны кратковременные максимальные выходы, зависящие от соотношения скоростей синтеза и гидролиза. В этом случае главным фактором, определяющим результат процесса, является происхождение фермента, влияющее на его структуру и свойства [8, 27].

Данные о снижении концентрации лактулозы после достижения максимума соответствуют известным положениям о том, что она может подвергаться гидролизу или трансгликозилированию с образованием фруктогалактоолигосахаридов. Лактоза тоже может быть акцептором для галактозила с образованием галактоолигосахаридов [1, 7]. Возможность протекания таких реакций подтверждается данными высокоэффективной жидкостной хроматографией – анализа полученных образцов, в частности, наличием на хроматограммах заметного пика (перед пиком лактозы) со временем удержания около 7 мин, который могут давать трисахара. Эти процессы требуют дополнительных исследований, в т. ч. с более высокими концентрациями лактозы.

Сопоставление данных об активности ферментов дрожжей и синтезе лактулозы показало, что между этими выходными параметрами есть взаимосвязь. Ряд штаммов дрожжей по убыванию значений активности полученных из них бета-галактозидаз выглядит так: *K. marxianus* Y-459 > *K. lactis* Y-1333 > *K. marxianus* Y-1338 > *K. lactis* Y-1339. Ряд штаммов дрожжей по выходу лактулозы, полученной с использованием выделенных из них ферментов (*K. marxianus* Y-459 > *K. lactis*

Y-1339 > *K. marxianus* Y-1333 > *K. lactis* Y-1338), имеет похожую последовательность. Исключением стал штамм *K. lactis* Y-1339, который дал неочищенные ферментные препараты с минимальной активностью, но второй результат по концентрации лактулозы.

Второй этап работы был посвящен исследованию процессов биосинтеза лактулозы с использованием комбинированных неочищенных ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидаз дрожжей и молочнокислых бактерий. Результаты определения углеводного состава образцов после биосинтеза лактулозы с использованием комбинированных неочищенных ферментных препаратов, полученных после совместного культивирования дрожжей с молочнокислыми бактериями, представлены в таблице 1. Для сравнения результатов биосинтеза данные расчета выхода лактулозы с использованием ферментов дрожжей *K. marxianus* и молочнокислых бактерий при отдельном и совместном культивировании были обобщены и показаны на рисунке 3, с *K. lactis* – на рисунке 4.

Анализ графиков на рисунке 3а показал, что синтез лактулозы с использованием ферментов, полученных при отдельном культивировании *K. marxianus* Y-459, протекает даже лучше, чем при совместном их культивировании с вязкой ацидофильной палочкой: максимальный выход лактулозы в ферментированном субстрате был получен через 30 мин реакции и составил 1,5 и 0,8 % соответственно. По-другому проходил синтез лактулозы в случае применения комбинированного неочищенного ферментного препарата, полученного при совместном культивировании *K. marxianus* Y-459 с вязким термофильным стрептококком. Максимальный выход лактулозы в ферментированном субстрате был получен через 60 мин реакции и достигал уровня 3,3 %, т. е. более чем в два раза выше, чем с другими ферментами. Активность  $\beta$ -галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. marxianus* Y-459 и *L. acidophilus* В, была в 1,7 раз выше, чем активность  $\beta$ -галактозидазы самих дрожжей, а при совместном культивировании *K. marxianus* Y-459 и *S. thermophilus* В – выше только в 1,4 раза.

С другим штаммом этого же вида дрожжей, *K. marxianus* Y-1338, были выявлены другие закономерности биосинтеза лактулозы (рис. 3б). При совместном его культивировании с вязкой ацидофильной палочкой были выделены  $\beta$ -галактозидазы, позволившие получить максимальный выход лактулозы на уровне около 2 % через 3 ч реакции, что почти в 2 раза выше, чем этот показатель для фермента самих дрожжей, полученный в тех же условиях. В случае применения комбинированных ферментов *K. marxianus* Y-1338 и *S. thermophilus* В был получен еще более высокий выход лактулозы – 2,7 % через 30 мин реакции (с незначительным снижением этого показателя к концу опыта). В то же время активность  $\beta$ -галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. marxianus* Y-1338 и *L. acidophilus* В, была в 2,6 раз выше, чем

активность β-галактозидазы самих дрожжей, а при совместном культивировании *K. marxianus* Y1338 и *S. thermophilus* B – выше только в 1,2 раза.

Анализ графиков на рисунке 4а показал, что процесс синтеза лактулозы с использованием ферментов *K. lactis* Y-1333, полученных при его раздельном

и совместном культивировании с вязкой ацидофильной палочкой, протекал примерно одинаково, и выход лактулозы был низким (не превышал 1,5 %). В случае применения комбинированного неочищенного ферментного препарата, полученного при совместном культивировании *K. lactis* Y-1333 с вязким термофильным

Таблица 1. Влияние времени ферментации на углеводный состав образцов с использованием комбинированных ферментов (средние по трем повторностям,  $p \leq 0,05$ ; A – активность бета-галактозидаз)

Table 1. Effect of fermentation time on carbohydrate composition of samples with combined enzymes (mean of three replicates,  $p \leq 0.05$ ; A – β-galactosidase activity)

Время ферментации, мин	Концентрация углеводов, мг/л					
	лактоза	лактuloза	глюкоза	галактоза	фруктоза	тагатоза
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-459 + <i>Lactobacillus acidophilus</i> B (A = 0,78 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	58733	268,39	58,192	253,59	52175	204,59
30	57862	384,31	68,354	238,83	51836	257,05
60	55988	307,50	79,112	255,07	49600	262,10
180	54451	332,78	81,319	244,41	47859	243,82
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-1338 + <i>Lactobacillus acidophilus</i> B (A = 0,86 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	52575	364,56	72,877	272,07	52137	123,95
30	52200	528,10	94,494	277,52	51858	97,005
60	51870	827,67	96,892	292,12	51130	143,94
180	50946	970,40	96,765	280,01	50603	207,78
<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-1333 + <i>Lactobacillus acidophilus</i> B (A = 0,81 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	55019	494,66	133,82	297,43	51988	н/о
30	54497	411,20	196,11	320,32	51765	н/о
60	53372	450,73	138,55	290,08	50133	н/о
180	53256	486,03	181,65	300,31	51820	н/о
<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-1339 + <i>Lactobacillus acidophilus</i> B (A = 0,59 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	54811	746,25	399,86	362,45	51895	51,480
30	54612	788,21	400,93	446,41	51697	52,014
60	54349	561,23	396,76	361,10	49860	18,184
180	53436	564,69	320,39	380,95	50212	26,373
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-459 + <i>Streptococcus thermophilus</i> B (A = 0,65 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	49378	1308,04	29,697	453,86	48428	н/о
30	47970	1539,09	26,838	483,04	47993	н/о
60	47608	1640,49	26,450	484,67	46604	н/о
180	45473	332,78	23,505	421,90	47533	н/о
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-1338 + <i>Streptococcus thermophilus</i> B (A = 0,38 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	59916	576,46	408,02	1320,26	49076	н/о
30	55496	1343,36	462,52	531,68	45772	н/о
60	54090	1077,23	458,45	1452,79	43252	н/о
180	53673	1253,35	462,47	525,983	44656	н/о
<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-1333 + <i>Streptococcus thermophilus</i> B (A = 0,72 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	57828	1211,07	95,116	715,62	46224	н/о
30	56313	1872,15	151,069	481,13	42620	н/о
60	52616	1836,19	160,282	453,03	41252	н/о
180	52133	1466,95	508,10	1296,60	42130	н/о
<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-1339 + <i>Streptococcus thermophilus</i> B (A = 0,39 ME/cm <sup>3</sup> )						
3	57103	793,05	60,751	716,54	46459	н/о
30	57012	1708,9	87,356	1202,55	45530	н/о
60	54915	1659,2	271,34	805,49	41635	н/о
180	57963	1367,3	576,20	1314,22	41061	н/о

Примечание: н/о – не обнаружено.

Note: н/о – not detected.

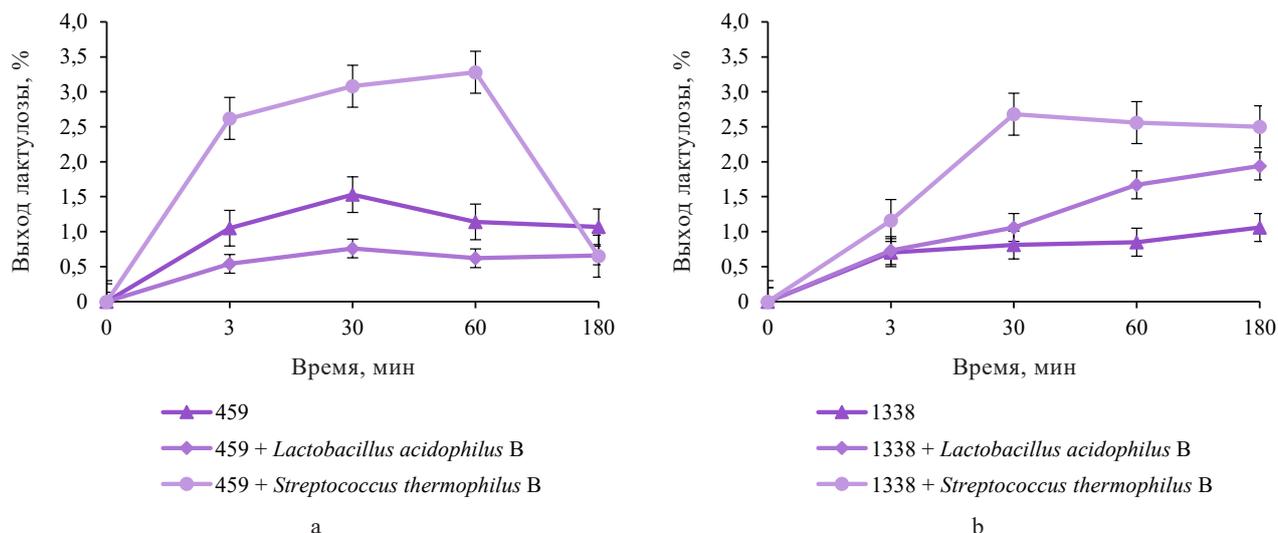


Рисунок 3. Влияние времени ферментации на биосинтез лактулозы с использованием ферментов дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-459 (а) и *Kluyveromyces marxianus* Y-1338 (б) при раздельном и совместном культивировании с вязкими штаммами молочнокислых бактерий

Figure 3. Effect of fermentation time on lactulose biosynthesis with enzymes of *Kluyveromyces marxianus* Y-459 (a) and *Kluyveromyces marxianus* Y-1338 (b) in separate and combined cultivation with lactic acid bacteria

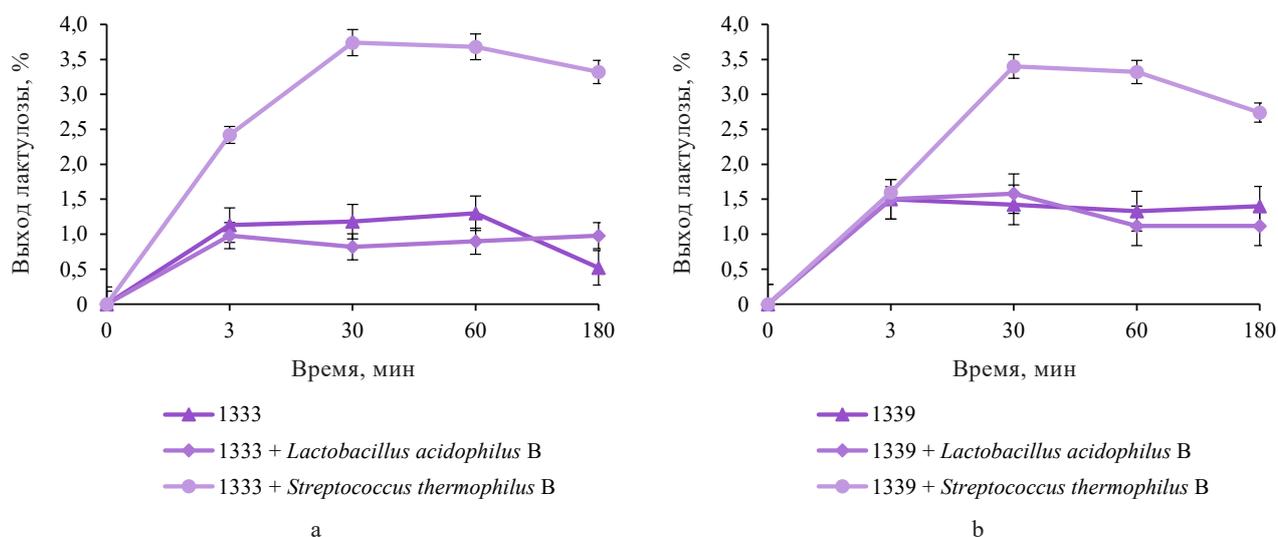


Рисунок 4. Влияние времени ферментации на биосинтез лактулозы с использованием ферментов дрожжей *Kluyveromyces lactis* Y-1333 (а) и *Kluyveromyces lactis* Y-1339 (б) при раздельном и совместном культивировании с вязкими штаммами молочнокислых бактерий

Figure 4. Effect of fermentation time on lactulose biosynthesis with enzymes of *Kluyveromyces lactis* Y-1333 (a) and *Kluyveromyces lactis* Y-1339 (b) in separate and combined cultivation with lactic acid bacteria

стрептококком, максимальный выход лактулозы был получен через 30–60 мин реакции и достигал уровня 3,7 %, т. е. более чем в 2,6 раза выше, чем с другими ферментами в этой серии опытов. При этом активность  $\beta$ -галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. lactis* Y-1333 и *L. acidophilus* B, была в 2,1 раз выше, чем активность  $\beta$ -галактозидазы

дрожжей, а при совместном культивировании *K. lactis* Y-1333 и *S. thermophilus* B – выше в 1,9 раза.

С ферментами другого штамма этого же вида дрожжей, *K. lactis* Y-1339, биосинтез лактулозы проходил похожим образом (рис. 4б). Отличием было получение более высоких концентраций лактулозы в первые 30 мин реакции с  $\beta$ -галактозидазами *K. lactis* Y-1339

и после совместного культивирования с *L. acidophilus* В, однако в дальнейшем выход лактулозы не увеличивался. В случае применения комбинированных ферментов *K. lactis* Y-1339 и *S. thermophilus* В максимальный выход лактулозы был получен на уровне 3,5 % через 30 мин реакции, что в 2,3 раза выше, чем в опытах с ферментом дрожжей *K. lactis* Y-1339. В то же время активность  $\beta$ -галактозидаз, полученных при совместном культивировании *K. lactis* Y-1339 и *L. acidophilus* В, была в 2,7 раз выше, чем активность  $\beta$ -галактозидазы самих дрожжей, а при совместном культивировании *K. lactis* Y-1339 и *S. thermophilus* В – выше только в 1,7 раза.

В целом можно сказать, что закономерности образования лактулозы под влиянием комбинированных неочищенных ферментных препаратов были похожи на ранее установленные для ферментов из дрожжей и больше зависят от штамма, чем от вида дрожжей. Максимальный выход лактулозы был достигнут в большинстве случаев в первые 3–30 мин реакции и варьировался от 0,5 до 3,7 %, после чего снижался или стабилизировался. Самые высокие выходы лактулозы были получены в экспериментах с совместным культивированием дрожжей и *S. thermophilus* В.

Для сравнения значений активности, комбинированных  $\beta$ -галактозидаз и максимальных концентраций лактулозы также были построены ряды штаммов дрожжей по убыванию значений:

– активности полученных из них бета-галактозидаз:  
*K. marxianus* Y-1338 + *L. acidophilus* В > *K. lactis* Y-1333 + *L. acidophilus* В > *K. marxianus* Y-459 + *L. acidophilus* В > *K. marxianus* Y-459 + *S. thermophilus* В > *K. lactis* Y-1333 + *S. thermophilus* В > *K. lactis* Y-1339 + *L. acidophilus* В > *K. lactis* Y-1339 + *S. thermophilus* В > *K. marxianus* Y-1338 + *S. thermophilus* В;

– максимальной концентрации лактулозы, полученной с использованием выделенных из них ферментов:

*K. lactis* Y-1333 + *S. thermophilus* В > *K. lactis* Y-1339 + *S. thermophilus* В > *K. marxianus* Y-459 + *S. thermophilus* В > *K. marxianus* Y-1338 + *S. thermophilus* В > *K. marxianus* Y-1338 + *L. acidophilus* В > *K. lactis* Y-1339 + *L. acidophilus* В > *K. lactis* Y-1333 + *L. acidophilus* В > *K. marxianus* Y-459 + *L. acidophilus* В.

Анализ полученных данных показал, что ряд сочетаний культур с максимальной гидролитической активностью фермента не совпадает полностью с рядом сочетаний культур, давших неочищенные ферментные препараты с максимальным выходом лактулозы, т. е. с максимальной трансгликозилирующей активностью. Если три первых места по гидролитической активности занимают сочетания дрожжей с *L. acidophilus* В (выделено жирным шрифтом), то три первых места по концентрации лактулозы принадлежат сочетаниям дрожжей с *S. thermophilus* В. Дрожжи *K. marxianus* Y-459 и *K. lactis* Y-1333 дали высокую активность фермента в сочетании и с *L. acidophilus* В, и с *S. thermophilus* В, причем сочетание *K. lactis* Y-1333 + *S. thermophilus*

В стало первым в ряду максимальных концентраций лактулозы. Дрожжи *K. lactis* Y-1338 в сочетании с *L. acidophilus* В дали ферменты с самой высокой гидролитической активностью и в сочетании с обеими культурами вязких молочнокислых бактерий попали в пятерку лучших по биосинтезу лактулозы. Тот факт, что три сочетания культур (подчеркнуты) в обоих рядах входят в число первых пяти, указывает на тесную взаимосвязь гидролитической и трансгликозилирующей активности ферментов, однако прямой зависимости между ними не установлено.

Следует отметить, что штамм *K. lactis* Y-1339 показывал низкую скорость роста на пермеате и относительно низкую гидролитическую активность ферментов как в чистых культурах, так и в сочетаниях с молочнокислыми бактериями. Сочетание *K. lactis* Y-1339 + *S. thermophilus* В стало вторым в ряду максимальных концентраций лактулозы, а сочетание *K. lactis* Y-1339 + *L. acidophilus* В дало 6 результат в этом ряду. Это свидетельствует о довольно высокой трансгликозилирующей активности комбинированных ферментов, полученных с использованием этого штамма дрожжей.

Представляют интерес данные о синтезе тагатозы, существенные концентрации которой были получены в опытах с тремя штаммами дрожжей (*K. marxianus* Y-459, *K. marxianus* Y-1338 и *K. lactis* Y-1339) и *L. acidophilus* В, но не обнаружены ни в одном эксперименте с отдельным культивированием дрожжей и совместным культивированием дрожжей с *S. thermophilus*. Тагатоза может применяться как низкокалорийный заменитель сахарозы в различных пищевых продуктах, в т. ч. для людей с диабетом, ожирением, анемией и гемофилией [1]. В результате биосинтеза были также получены неидентифицированные олигосахариды со временем выхода пиков раньше лактозы (7,4–7,7 мин), причем их концентрация была выше в опытах со всеми дрожжами и *L. acidophilus* В, чем с *S. thermophilus* В (типичные хроматограммы показаны на рис. 5). Согласно результатам ряда исследований, это могут быть галактоолигосахариды, обладающие активными пребиотическими свойствами [1, 7].

Одной из причин повышения активности комбинированных ферментов по сравнению с ферментами дрожжей может быть интенсификация разрушения и пермеабиллизации клеток продуцентов под воздействием метаболитов разных продуцентов (молочной кислоты, спирта), образовавшихся при их совместном культивировании [28]. Высокий выход лактулозы при комбинированных ферментах дрожжей с термофильным стрептококком может быть обусловлен отсутствием у него способности утилизировать галактозу, что характерно для большинства штаммов этого вида [29]. Следствием этого было повышенное содержание галактозы в субстрате, что подтверждается данными экспериментов (табл. 1), и ее возможное участие в образовании лактулозы. Аналогичные эксперименты, проведенные с невязкими расами *L. acidophilus* и *S. thermophilus*, не поз-

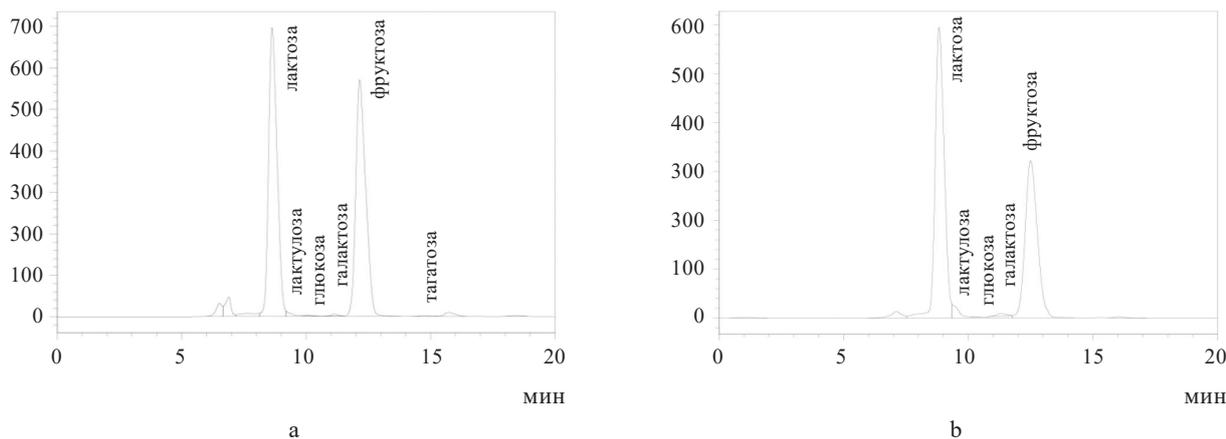


Рисунок 5. Хроматограммы образцов: а – с использованием ферментов *Kluyveromyces marxianus* 1338 и *Lactobacillus acidophilus* В через 3 ч ферментации; б – *Kluyveromyces lactis* 1333 и *Streptococcus thermophilus* В через 30 мин ферментации

Figure 5. Chromatograms: а – enzymes of *Kluyveromyces marxianus* 1338 and *Lactobacillus acidophilus* В after 3 h of fermentation; б – *Kluyveromyces lactis* 1333 and *Streptococcus thermophilus* В after 30 min of fermentation

волили получить выход лактулозы выше 1 %, поэтому можно предположить, что штаммовый состав этих микроорганизмов существенно влияет на трансгликозилирующую активность ферментов. Все эти предположения требуют дополнительных исследований.

### Выводы

К общим закономерностям образования лактулозы при использовании ферментов исследованных дрожжей можно отнести быстрый рост ее концентрации в течение первых 30 мин реакции, после чего происходит ее снижение или стабилизация. В дальнейшем закономерности биосинтеза лактулозы значительно отличались в опытах с ферментами, полученными из дрожжей не только разных видов, но и разных штаммов одного вида. Полученные данные соответствуют известным теоретическим положениям о кинетически контролируемых реакциях, для которых характерны кратковременные максимальные выходы, зависящие от соотношения скоростей синтеза и гидролиза.

Активность некоторых комбинированных неочищенных ферментных препаратов дрожжей и молочнокислых микроорганизмов существенно превышает активность бета-галактозидаз продуцентов после их раздельного культивирования. Анализ полученных данных показал, что ряд сочетаний культур с максимальной гидролитической активностью фермента не совпадает полностью с рядом сочетаний культур, давших неочищенные ферментные препараты с максимальным выходом лактулозы. Показана взаимосвязь гидролитической и трансгликозилирующей активности полученных  $\beta$ -галактозидаз, однако прямой зависимости между ними не установлено.

Закономерности образования лактулозы под влиянием комбинированных неочищенных ферментных пре-

паратов зависят как от штамма дрожжей, так и от вида молочнокислых бактерий. Это подтверждают полученные другими исследователями выводы о том, что при биосинтезе лактулозы главным фактором, определяющим результат процесса, является происхождение фермента, влияющее на его структуру и свойства. Самые высокие выходы лактулозы были получены при использовании комбинированных  $\beta$ -галактозидаз исследованных штаммов дрожжей (*Kluyveromyces lactis* ВКМ Y-1333 и Y-1339, *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y-459 и Y-1338) с вязкими расами *S. thermophilus*.

Совместное культивирование дрожжей и молочнокислых бактерий, продуцентов разных по свойствам  $\beta$ -галактозидаз в некоторых сочетаниях позволило получить комбинированные неочищенные ферментные препараты с более высокой активностью и более высокие выходы лактулозы, чем отдельное культивирование дрожжей. Данные результаты могут быть использованы для получения очищенных ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидаз и лактулозосодержащих продуктов из вторичного молочного сыра.

### Критерии авторства

С. А. Рябцева – концептуализация, курирование данных, методология, проверка, визуализация, написание – оригинальный черновик, написание – обзор и редактирование. М. А. Шпак – курирование данных, формальный анализ, исследование, проверка, написание – обзор и редактирование. А. Д. Лодыгин – привлечение финансирования, методология, администрация проекта, надзор, проверка, написание – обзор и редактирование. А. В. Серов – курирование данных, формальный анализ, проверка, написание – обзор и редактирование. С. Н. Сазанова – формальный анализ, исследование, написание – обзор и редактирование.

М. В. Скороходова – формальный анализ, исследование, написание – обзор и редактирование. В. Ю. Ромахова – формальный анализ, исследование, написание – обзор и редактирование.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Contribution

S.A. Ryabtseva was responsible for the research concept, data curation, methodology, validation, visualization, original draft, and proofreading; M.A. Shpak provided the data curation, formal analysis, research, review,

and proofreading; A.D. Lodygin dealt with the fundraising, methodology, project administration, supervision, review, and proofreading; A.V. Serov was responsible for the data curation, formal analysis, verification, review, and proofreading; S.N. Sazanova did the formal analysis, research, review, and proofreading; M.V. Skorokhodova provided the formal analysis, research, review, and proofreading; V.Yu. Romakhova was responsible for the formal analysis, research, review, and proofreading.

#### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest regarding the publication of this article.

#### References/Список литературы

1. Vera C, Guerrero C, Illanes A. Trends in lactose-derived bioactives: synthesis and purification. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. 2022;2:393–412. <http://doi.org/10.1007/s43393-021-00068-2>
2. Nooshkam M, Babazadeh A, Jooyandeh H. Lactulose: Properties, technofunctional food applications, and food grade delivery system. *Trends in Food Science and Technology*. 2018;80:23–34. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.028>
3. Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Budkevich RO, Anisimov GS, Chuklo AO, Shpak MA. Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose. *Problems of Nutrition*. 2020;89(2):5–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10012>; <https://www.elibrary.ru/TNXHMH>
4. Ryabtseva SA. Lactulose technology. Moscow: DeLi print; 2003. 232 p. (In Russ.). [Рябцева С. А. Технология лактулозы. М.: ДеЛи принт, 2003. 232 с.]
5. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Recent advances on prebiotic lactulose production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016;32(9):154. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2103-7>
6. Silvério SC, de Macedo EA, Teixeira JA, Rodrigues LR. Biocatalytic approaches using lactulose: end product compared with substrate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;15(5):878–896. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12215>
7. Vera C, Illanes A. Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products. In: Illanes A, Guerrero C, Vera C, Wilson L, Conejeros R, Scott F, editors. *Lactose-derived prebiotics. A process perspective*. Academic Press; 2016. pp. 87–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00003-2>
8. Wang M, Wang L, Lyu X, Hua X, Goddard JM, Yang R. Lactulose production from lactose isomerization by chemo-catalysts and enzymes: Current status and future perspectives. *Biotechnology Advances*. 2022;60:108021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108021>
9. Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Shpak MA, Lodygin AD, Anisimov GS, Sazanova SN, et al. Biotechnology of Lactulose Production: Progress, Challenges, and Prospects. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(1):97–122c. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419>; <https://www.elibrary.ru/DVBEZS>
10. de Albuquerque TL, de Sousa M, Gomes e Silva NC, Girão Neto CAC, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R, et al.  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;191:881–898. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>
11. Lyutova LV, Naumov GI, Shnyreva AV, Naumova ES. Molecular polymorphism of  $\beta$ -galactosidase LAC4 genes in dairy and natural strains of *Kluyveromyces yeasts*. *Molecular Biology*. 2021;55(1):75–85. (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0026898421010109>; <https://www.elibrary.ru/DXUCCI>
12. Lyutova LV, Naumova ES. Inter-strain hybridization of *Kluyveromyces lactis* for creating efficient lactose-fermenting yeast. *Biotekhnologiya*. 2021;37(4):43–50. (In Russ.). <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-4-43-50>; <https://www.elibrary.ru/XZBKCB>
13. Lyutova LV, Naumova ES. Comparative analysis of fermentation of lactose and its components, glucose and galactose, by interstrain hybrids of dairy yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology*. 2023;39(1):3–11. (In Russ.). <https://doi.org/10.56304/S0234275823010064>; <https://www.elibrary.ru/BMMPOR>
14. Ruiz-Ramírez S, Jiménez-Flores R. Properties of  $\beta$ -Galactosidases derived from *Lactobacillaceae* species and its capacity for galacto-oligosaccharides production. *Journal of Dairy Science*. 2023;106(12):8193–8206. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23392>
15. Dorau R, Jensen PR, Solem C. Purified lactases versus whole-cell lactases-the winner takes it all. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105:4943–4955. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11388-7>

16. Wang Q, Lillevang SK, Rydtoft SM, Xiao H, Fan M-T, Solem C, *et.al.* No more cleaning up - Efficient lactic acid bacteria cell catalysts as a cost-efficient alternative to purified lactase enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104:6315–6323. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10655-3>
17. Hashem AM, El-Azeem Ismail SA, Helmy WA, El-Mohamady Y, Abou-Romia R. Factors affecting the production of lactulose by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495 b-galactosidase and its biological activity. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2013;9(1):1–6. <http://doi.org/10.21161/mjm.43612>
18. Ryabtseva SA, Kotova AA, Skripnyuk AA. Yeast in the processing of dairy raw materials. St. Petersburg: Lan; 2019. 120 p. (In Russ.). [Рябцева С. А., Котова А. А., Скрипнюк А. А. Дрожжи в переработке молочного сырья: монография. СПб: Лань, 2019. 120 с.]
19. Botvynko A, Bednářová A, Henke S, Shakhno N, Čurda L. Production of galactooligosaccharides using various combinations of the commercial  $\beta$ -galactosidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;517(4):762–766. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.001>
20. Inchaurredo VA, Yantorno OM, Voget CE. Yeast growth and beta-galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process biochemistry*. 1994;29(1):47–54. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80058-8](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80058-8)
21. Guerrero C, Vera C, Plou F, Illanes A. Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial b-galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;72(3–4):206–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.007>
22. Hua X, Yang R, Shen Q, Ye F, Zhang W, Zhao W. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in the presence of fructose. *Food Chemistry*. 2013;137(1–4):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.003>
23. Sitanggang AB, Drews A, Kraume M. Influences of operating conditions on continuous lactulose synthesis in an enzymatic membrane reactor system: A basis prior to long-term operation. *Journal of Biotechnology*. 2015;203:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.016>
24. De Albuquerque TL, Gomes SDL, D’Almeida AP, Fernandez-Lafuente R, Gonçalves LRB, Rocha MVP. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. *Process Biochemistry*. 2018;73:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.010>
25. Neto CACG, Silva NCGE, de Oliveira Costa T, de Albuquerque TL, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R, *et.al.* The beta-galactosidase immobilization protocol determines its performance as catalysts in the kinetically controlled synthesis of lactulose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;176:468–478. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.078>
26. Lee Y-J, Kim CS, Oh D-K. Lactulose production by beta-galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;64:787–793. <http://doi.org/10.1007/s00253-003-1506-1>
27. Guerrero C, Vera C, Conejeros R, Illanes A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*. 2015;70:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
28. Ryabtseva SA, Skripnyuk AA, Kotova AA, Khramtsov AG, Rodnaya AB, Lodygin AD, *et al.* Method for combined enzyme beta-galactosidase production. Russia Patent Ru 2622078. 2017. [Способ получения комбинированного ферментного препарата бета-галактозидаз: пат. 2622078 Рос.Федерация. № 2016100779 / Рябцева С. А. [и др.]; заявл. 21.01.2016; опубл. 09.06.2017. Бюл. № 16.]
29. Zhao R, Chen Z, Liang J, Dou J, Guo F, Xu Z, *et.al.* Advances in Genetic Tools and Their Application in *Streptococcus thermophilus*. *Foods*. 2023;12(16):3119. <https://doi.org/10.3390/foods12163119>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534>  
<https://elibrary.ru/OOVUEP>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Оценка содержания вторичных метаболитов и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур и микрорастений *in vitro* *Hyssopus officinalis* L.



Е. А. Попова\*<sup>ORCID</sup>, А. В. Пунгин<sup>ORCID</sup>, А. П. Пантюхина<sup>ORCID</sup>, О. В. Кроль<sup>ORCID</sup>

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта<sup>ORCID</sup>, Калининград, Россия

Поступила в редакцию: 08.04.2024

Принята после рецензирования: 13.05.2024

Принята к публикации: 04.06.2024

\*Е. А. Попова: [elena\\_popova97@mail.ru](mailto:elena_popova97@mail.ru),

<https://orcid.org/0000-0001-7008-3823>

А. В. Пунгин: <https://orcid.org/0000-0001-8374-3907>

А. П. Пантюхина: <https://orcid.org/0009-0009-5907-290X>

О. В. Кроль: <https://orcid.org/0000-0001-8030-3068>

© Е. А. Попова, А. В. Пунгин, А. П. Пантюхина, О. В. Кроль, 2024



### Аннотация.

*Hyssopus officinalis* L. – ценное лекарственное растение, экстракты которого обладают рядом биологически активных эффектов и перспективны для использования в различных отраслях промышленности. Актуальным является использование биотехнологических методов получения важных вторичных метаболитов, например с применением каллусных культур. Важным вопросом остается соответствие культур по качественному и количественному содержанию целевых веществ. Целью данного исследования являлась сравнительная оценка накопления вторичных метаболитов фенольной природы, антиоксидантной и антимикробной активности экстрактов трех каллусных культур, нативных растений, микрорастений *in vitro* и коммерческого препарата *H. officinalis*.

Экстракты исследуемых объектов были получены с использованием 70 % этанола. Содержание фенольных соединений, флавоноидов, гидроксикоричных кислот, танинов определяли по стандартным методикам. Определение содержания отдельных фенольных соединений проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Антиоксидантную активность определяли с использованием трех методов (DPPH, FRAP и ABTS). Оценку антимикробной и фунгицидной активности проводили диско-диффузионным методом.

Высокий индекс роста сырой биомассы каллусов ( $11,6 \pm 1,4$ ) наблюдали на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 1 мг/л 2,4-Д (MS-6). Культура MS-6, по сравнению с остальными исследуемыми объектами, отличалась высоким содержанием фенольных соединений ( $35,5 \pm 1,2$  мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), гидроксикоричных кислот ( $82,5 \pm 2,6$  мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы), танинов ( $49,6 \pm 0,8$  мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), розмариновой ( $20,25 \pm 1,84$  мг/г сухой массы) и кофейной ( $1,48 \pm 0,08$  мг/г сухой массы) кислот. Экстракты данной культуры показали значительную антиоксидантную активность согласно методу DPPH ( $127,8 \pm 5,6$  мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) и FRAP ( $15,9 \pm 1,3$  мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы), а также слабую антибактериальную и фунгицидную активность при концентрации экстракта 2 мг/диск в отношении *Bacillus subtilis* ( $7,2 \pm 0,2$  мм), *Candida albicans* ( $7,0 \pm 0,2$  мм) и при концентрации экстракта 1 мг/диск ( $7,0 \pm 0,3$  мм) и 2 мг/диск ( $7,3 \pm 0,1$  мм) в отношении *Escherichia coli*.

Исследуемые экстракты каллусных культур *H. officinalis* и микрорастений *in vitro* в сравнении с экстрактом нативного растения показали наилучший выход вторичных метаболитов, что доказывает перспективность применения биотехнологического метода получения из клеточных культур ценных соединений.

**Ключевые слова.** Каллус, фенольные соединения, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, танины, антиоксидантная активность, антимикробная активность

**Для цитирования:** Оценка содержания вторичных метаболитов и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур и микрорастений *in vitro* *Hyssopus officinalis* L. / Е. А. Попова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 658–674. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534>

## Evaluating Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *in vitro* Callus and Micro-Plant Extracts of *Hyssopus officinalis* L.



Elena A. Popova\*<sup>ORCID</sup>, Artem V. Pungin<sup>ORCID</sup>,  
Anastasia P. Pantyukhina<sup>ORCID</sup>, Olesya V. Krol<sup>ORCID</sup>

Immanuel Kant Baltic Federal University<sup>ORCID</sup>, Kaliningrad, Russia

Received: 08.04.2024  
Revised: 13.05.2024  
Accepted: 04.06.2024

\*Elena A. Popova: [elena\\_popova97@mail.ru](mailto:elena_popova97@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-7008-3823>  
Artem V. Pungin: <https://orcid.org/0000-0001-8374-3907>  
Anastasia P. Pantyukhina: <https://orcid.org/0009-0009-5907-290X>  
Olesya V. Krol: <https://orcid.org/0000-0001-8030-3068>

© E.A. Popova, A.V. Pungin, A.P. Pantyukhina, O.V. Krol, 2024



### Abstract.

*Hyssopus officinalis* L. is a valuable medicinal plant. Its extracts have good commercial prospects as biologically active substances. Biotechnological production methods that yield valuable secondary metabolites often involve callus cultures, which differ in qualitative and quantitative content of target substances. This research compared phenolic secondary metabolites, antioxidants, and antimicrobial activities in extracts of three callus cultures *in vitro*, native plants, micro-plants and a commercial preparation of *H. officinalis*.

The extracts were obtained using 70% ethanol. The content of phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and tannins was determined by standard methods. The method of high-performance liquid chromatography revealed the content of individual phenolic compounds. The antioxidant activity tests relied on DPPH, FRAP, and ABTS. The antimicrobial and fungicidal activity was assessed by the disc-diffusion method.

The Murashige-Skoog medium with 0.2 mg/L 6-benzylaminopurine and 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid demonstrated a high growth index of callus crude biomass ( $11.6 \pm 1.4$ ). The same culture was rich in phenolic compounds ( $35.5 \pm 1.2$  mg-eq. gallic acid/g solids), hydroxycinnamic acids ( $82.5 \pm 2.6$  mg-eq. rosmarinic acid/g solids), tannins ( $49.6 \pm 0.8$  mg-eq. gallic acid/g solids), rosmarinic acid ( $20.25 \pm 1.84$  mg/g solids), and caffeic acid ( $1.48 \pm 0.08$  mg/g solids). Its extracts showed significant antioxidant activity according to DPPH ( $127.8 \pm 5.6$  mg-eq. ascorbic acid/g solids) and FRAP ( $15.9 \pm 1.3$  mg-eq. ascorbic acid/g solids). However, they had a rather weak antibacterial and fungicidal activity against *Bacillus subtilis* ( $7.2 \pm 0.2$  mm) and *Candida albicans* ( $7.0 \pm 0.2$  mm) at a concentration of 2 mg/disk. The antibacterial and fungicidal activity against *Escherichia coli* was equally weak at 1 mg/disk ( $7.0 \pm 0.3$  mm) and 2 mg/disk ( $7.3 \pm 0.1$  mm), respectively.

The extracts of *H. officinalis* callus cultures and micro-plants *in vitro* produced the best yield of secondary metabolites compared to the native plant extract. Biotechnological methods proved effective in obtaining valuable compounds from cell cultures.

**Keywords.** Callus, phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids, tannins, antioxidant activity, antimicrobial activity

**For citation:** Popova EA, Pungin AV, Pantyukhina AP, Krol OV. Evaluating Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *in vitro* Callus and Micro-Plant Extracts of *Hyssopus officinalis* L. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4): 658–674. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2534>

### Введение

Иссоп лекарственный (*Hyssopus officinalis* L.) – полукустарник, относящийся к семейству яснотковые (*Lamiaceae* Lindl.). Центр формирования *H. officinalis* связан с областью Древнего Средиземноморья и имеет достаточно обширный ареал [1]. *H. officinalis* использовали как лечебное и кулинарное растение. Данный вид является фармакопейным в таких странах как Франция, Португалия и Румыния [2]. Основными фитоконпонентами *H. officinalis* являются флавоноиды

(апигенин, диосмин, кверцетин, лютеолин и их производные), дубильные вещества, фенольные и гидросикоричные кислоты, эфирное масло [1, 3, 4]. Растение обладает антиоксидантным, антибактериальным, противовирусным, спазмолитическим, противовоспалительным и цитотоксическим действием [2, 4, 5].

Все вышеперечисленное делает *H. officinalis* перспективным растением для получения важных биологически активных веществ. Важно понимать, что их получение из нативного растения имеет ряд ограничений,

таких как сезонность, ареал произрастания, требования к почвенным условиям и другие [6]. Поэтому биотехнологические методы получения вторичных метаболитов из растений являются очень перспективными в дополнение к производству, осуществляемому классическими методами растениеводства. Методы культивирования тканей растений, например каллусных культур, в некоторых случаях обеспечивают скорость производства вторичных метаболитов в более высоких количествах, исключая ингибирующее воздействие факторов окружающей среды [7, 8].

Для успешной индукции каллуса очень важны такие факторы, как питательная среда, регуляторы роста, типы эксплантов и условия культивирования [9]. В литературе имеются данные влияния типов эксплантов, регуляторов роста и элиситоров на индукцию образования каллусной культуры *H. officinalis* [10–13]. К настоящему моменту для получения каллуса в качестве эксплантов использовали листья, гипокотили и корни трехнедельных проростков *H. officinalis* [10, 12]. Наибольшую способность к индукции каллуса показали культивированные *in vitro* экспланты гипокотилей, за которыми следуют корни и листья [10].

Предыдущие исследования по влиянию регуляторов роста на каллусогенез *H. officinalis* показали, что наибольшая частота образования каллуса была получена на двух средах Мурасиге-Скуга (MS): содержащей 2 мг/л 6-бензиламинопурина с добавлением 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и содержащей 2 мг/л 6-бензиламинопурина с добавлением 1 или 2 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты [10, 11, 14]. В другом исследовании сообщалось, что оптимальной питательной средой для индукции каллусогенеза была среда MS с 1 мг/л индолил-3-масляной кислоты и среда с 0,5 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты, 0,1 мг/л кинетина и 1 мг/л 6-бензиламинопурина [12]. Были получены данные о значительном влиянии на каллусогенез эксплантатов листьев и черешков различных концентраций нитропруссиды натрия и 2,4-Д. Концентрации нитропруссиды натрия 20 мкм индуцировали каллусогенез до 72 %, но в сочетании с концентрациями 2,4-Д каллусогенез увеличивался до 100 %. В отсутствие нитропруссиды натрия каллусы не образовывались. Наблюдалось значительное влияние 2,4-Д и нитропруссиды натрия на увеличение массы свежего каллуса [15].

Клеточные культуры *H. officinalis*, полученные из гипокотилей, продуцируют два стерола ( $\beta$ -ситостерол и стигмастерол) и несколько известных тритерпенов, например олеаноловую и урсоловую кислоты [13]. В нашем предыдущем исследовании была проведена оценка условий культивирования каллусных культур *H. officinalis* в отношении выхода полифенольных соединений [16]. Было обнаружено, что среда Мурасиге-Скуга, дополненная 2 мг/л кинетина в сочетании с 3 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты, приводила к наибольшему выходу вторичных метаболитов, в част-

ности флавоноидов и полифенольных соединений, повышению антиоксидантной активности экстрактов.

При использовании методов культуры тканей растений с целью биосинтеза вторичных метаболитов, немаловажным является соответствие полученного продукта по качественному и количественному содержанию биологически активных веществ, сопоставимых с растительным сырьем, получаемым традиционным способом. Имеющиеся в литературе данные недостаточно раскрывают потенциал каллусных культур *H. officinalis* в продукции важных биологически активных веществ.

Цель настоящего исследования заключалась в сравнительной оценке накопления вторичных метаболитов фенольной природы, антиоксидантной и антимикробной активности экстрактов трех каллусных культур, нативных растений, микрорастений *in vitro* и коммерческого растительного препарата *H. officinalis*.

### Объекты и методы исследования

Для получения каллуса и культуры растений *in vitro* использовали асептические проростки *Hyssopus officinalis*, которые были получены из семян фирмы «Гавриш» сорта «Лекарь». Для получения каллусных культур листовые экспланты помещали в чашки Петри на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением сахарозы (в объеме 3 %) и агара (в объеме 0,7 %), pH питательной среды 5,6–5,8 [14]. Для индукции каллусогенеза и последующего культивирования использовали три варианта модифицированной среды MS: MS-2 с добавлением 2 мг/л кинетина и 3 мг/л 1-нафталинуксусной кислоты; MS-5 с добавлением 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мг/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты; MS-6 с добавлением 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Культивирование проводили в условиях термостата при 25 °C в течение 4 недель. Субкультивирование на свежую питательную среду осуществляли каждые 4 недели.

Для изучения содержания биологически активных веществ в культурах растений *in vitro* асептические проростки *H. officinalis* помещали в емкость для культивирования растений Phytohealth (SPL Lifesciences, Naechon-Myeon, Республика Корея) на среду MS, дополненную сахарозой (в объеме 3 % от количества питательной среды) и агаром (в объеме 0,7 % от количества питательной среды), без добавления регуляторов роста, pH среды 5,6–5,8. Клональное размножение осуществляли методом черенкования придаточных побегов каждые 4 недели. Культуры выдерживали в комнате для выращивания при температуре  $25 \pm 2$  °C с использованием 16-часового фотопериода (белые светодиодные лампы; плотность потока фотосинтетических фотонов 160 мкмоль/м<sup>2</sup>·с).

Нативные растения *H. officinalis* сорта «Лекарь» выращивались в 2022–2023 гг. на экспериментальном

участке на территории ботанического сада Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта (Калининград, Россия). Для эксперимента в период цветения (август 2023 г.) была собрана надземная часть двулетних растений (соцветия, листья и стебли).

Коммерческий растительный препарат фиточай фирмы «Травы Горного Крыма», содержащий надземные части *Hyssopus officinalis*, выступал в нашем исследовании в качестве примера, как растительное сырье, получаемое традиционным способом.

Для оценки ростовых характеристик каллусных культур в условиях ламинар-бокса отбирали 0,250 г сырой биомассы каллусной культуры (с точностью до 0,001 г) и переносили на свежую питательную среду соответствующего состава ( $n = 5$ ). Далее прирост сырой и сухой биомассы (с точностью до 0,001 г) измеряли каждые 5 дней на протяжении 50 дней. Для определения сухой биомассы каллусы сушили до постоянной массы при температуре 60 °С. Индекс роста рассчитывали как отношение разницы массы каллуса в начале и конце цикла выращивания к начальной массе каллуса [17].

Для приготовления экстрактов сухой растительный материал измельчали до размера частиц менее 0,5 мм. Навеску растительного сырья массой 0,5 г мацерировали в 45 мл 70 % раствора этанола при комнатной температуре в течение 24 ч. После экстракты центрифугировали в течение 30 мин при 3900 g на центрифуге Eppendorf 5810R. Далее супернатант переливали в мерную колбу на 50 мл и доводили объем 70 % этанолом до метки.

Общее содержание фенольных соединений определяли с помощью реактива Фолина-Чокалтеу [18]. Для этого к 100 мкл исследуемого экстракта добавляли 300 мкл реактива Фолина-Чокалтеу, 3 мл 11,5 % раствора карбоната натрия, 2,6 мл дистиллированной воды и перемешивали. Спустя 20 мин измеряли поглощение растворов при длине волны 720 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду. Галловую кислоту использовали в качестве калибровочного стандарта. Общее содержание фенольных соединений определяли по градуировочному графику и выражали

в мг – эквивалентах галловой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. галловой кислоты/г СМ) (табл. 1).

Суммарное содержание флавоноидов определяли на основе реакции комплексообразования с хлоридом алюминия спектрофотометрическим методом [19]. С этой целью к 1 мл исследуемого экстракта добавляли 2 мл 2 % раствора хлорида алюминия в 95 % этаноле, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводили объем раствора до 10 мл 95 % этанолом. Для каждого экстракта готовили раствор сравнения без добавления 2 % раствора хлорида алюминия. Поглощение растворов измеряли по истечению 30 мин при 410 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). Рутин использовали в качестве калибровочного стандарта. Общее содержание флавоноидов определяли по градуировочному графику и выражали в мг-экв. рутина на грамм сухой массы (мг-экв. рутина/г сухой массы) (табл. 1).

Общее содержание гидроксикоричных кислот проводили с использованием реактива Арно [20, 21]. Для этого к 1 мл растительного экстракта добавляли 2 мл 0,5 М HCl, 2 мл реагента Арно и 2 мл 8,5 % NaOH. Объем раствора доводили до 10 мл дистиллированной водой. Раствор сравнения готовился отдельно для каждого экстракта без добавления реактива Арно. Поглощение растворов измеряли при 505 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). Для построения калибровочного графика использовали розмариновую кислоту. Суммарное содержание гидроксикоричных кислот определяли по градуировочному графику и выражали в мг-экв. розмариновой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы) (табл. 1).

Суммарное содержание танинов определяли с использованием реакции образования окрашенного в синий цвет раствора берлинской лазури спектрофотометрическим методом [22]. Определение проходило в два этапа. На первом этапе осуществляли определение суммарного содержания всех полифенолов. Для этой цели в колбы на 50 мл добавляли 25 мл бидистиллированной воды, 250 мкл растительного экстракта, 3 мл FeCl<sub>3</sub>, затем перемешивали. В качестве контроля использовали бидистиллированную воду. Через 3 мин добавляли

Таблица 1. Градуировочные кривые уравнений стандартов фенольных соединений

Table 1. Calibration curves for phenolic compound standards

Метод исследования	Стандарт	Диапазон, мг/мл	Уравнение	R <sup>2</sup>
Содержание фенольных соединений	галловая кислота	0,01–0,20	$y = 1,293x + 0,004$	0,999
Содержание флавоноидов	рутин	0,01–0,15	$y = 3,328x + 0,007$	0,998
Содержание танинов	галловая кислота	0,01–0,80	$y = 2,9824x + 0,0093$	0,996
Содержание гидроксикоричных кислот	розмариновая кислота	0,01–0,40	$y = 1,967x + 0,032$	0,998
Антиоксидантная активность (DPPH)	аскорбиновая кислота	0,01–0,15	$y = 6,708x + 0,038$	0,996
Антиоксидантная активность (ABTS)	аскорбиновая кислота	0,001–0,075	$y = 9,060x + 0,008$	0,999
Антиоксидантная активность (FRAP)	аскорбиновая кислота	0,01–0,15	$y = 15,973x - 0,079$	0,997

3 мл раствора  $K_3Fe(CN)_6$ , перемешивали и через 10 мин снимали показания оптической плотности растворов на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония) при длине волны 720 нм. На втором этапе проводили определение остаточных полифенолов путем проведения осаждения танинов желатином и коагином. Для этого к 10 мл экстракта добавляли 5 мл раствора желатина (1 % раствор желатина в 10 % растворе NaCl), 2 г каолина, перемешивали в течение 5 мин. Далее смесь отфильтровали, а с фильтратом проводили те же манипуляции, описанные для первого этапа. Суммарное содержание танинов определяли как разность между суммарным содержанием полифенолов и остаточным содержанием полифенолов. Для построения калибровочного графика в качестве стандарта использовали галловую кислоту. Общее содержание танинов определяли по градуировочному графику и выражали в мг-экв. галловой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) (табл. 1).

Для определения содержания отдельных фенольных соединений в экстрактах использовали методы высокоэффективной жидкостной хроматографии [23, 24]. Экстракты, приготовленные как описано выше, фильтровали и концентрировали на вакуумном центробежном испарителе Concentrator plus (Eppendorf, Германия). Полученное сухое вещество растворяли в 10 % растворе метанола. Новый экстракт 20 мин центрифугировали (4500×g) и надосадочную жидкость фильтровали через шприцевой фильтр (0,22 мкм). Анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором Shimadzu SPD20MA и колонкой Phenomenex Luna (C18 250×4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза представляла собой смесь растворителей вода/трифторуксусная кислота 99,9/0,1 (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель Б). Для разделения веществ использовали градиентный режим, скорость потока 1,0 мл/мин, температуру колонки 40 °С и объем пробы 10 мкл. Детектирование осуществляли в диапазоне длин волн 180–900 нм. Идентификацию соединений проводили в программе LabSolutions путем сравнения времен удерживания пиков и УФ-спектров, полученных на хроматограммах, с соответствующими параметрами хроматографически чистых стандартов образцов. Количественный анализ изученных флавоноидов проводили по градуировочным графикам, построенным в диапазоне концентраций 10–100 мкг/мл. Использовали следующие стандарты Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Rus, Москва, Россия): кофейная кислота, кафтаровая кислота, цикориевая кислота, розмариновая кислота, 7-О-глюкозид апигенина и 7-О-глюкозид лютеолина.

Антиоксидантную активность оценивали по методу DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), FRAP (Fe(III)-2,4,6-три(2-пиридил)-s-триазин комплекс) и ABTS (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты)) [23]. В качестве стандарта использовали растворы аскорбиновой кислоты известной концентрации (табл. 1). Результаты анализа выражаются в мг-экв.

аскорбиновой кислоты на грамм сухой массы (мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы).

Для анализа методом DPPH брали 10, 20, 30 мкл экстракта и добавляли 2,85 мл раствора DPPH. Объем доводили до 3,10 мл этиловым спиртом. В качестве раствора сравнения вместо экстракта использовали смесь, содержащую раствор DPPH и 70 % этанол. Растворы оставляли на 60 мин в темном месте. После чего измеряли снижение поглощения при 515 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония).

При определении антиоксидантной активности ABTS предварительно готовили раствор радикала ABTS. Радикал ABTS получали путем смешивания аликвот 7,0 мМ раствора ABTS и 2,45 мМ раствора персульфата калия. Полученный раствор выдерживали в течение 16 ч в темноте при комнатной температуре. Для проведения реакции в каждую лунку микропланшета добавляли 300 мкл приготовленного раствора катионного радикала ABTS и 20 мкл экстракта или стандарта. Полученную смесь инкубировали в течение 15 мин при 37 °С в темноте и измеряли оптическое поглощение при длине волны 734 нм (CLARIOstar, BMG Labtech, Германия).

Для определения восстановительной способности экстрактов использовали свежеприготовленный реагент FRAP. Реагент FRAP получали путем смешивания 10 частей 0,3 М ацетатного буфера (pH 3,6), 1 части 10 мМ раствора 2,4,6-трипиридил-s-триазина в 40 мМ HCl и 1 части 20 мМ водного раствора хлорида железа  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ . Для проведения реакции в каждую лунку микропланшета добавляли 300 мкл реагента FRAP и 20 мкл исследуемого экстракта или стандартного раствора. Полученную смесь выдерживали в течение 10 мин при 37 °С в темноте; оптическое поглощение измеряли при длине волны 593 нм (CLARIOstar, BMG Labtech, Германия).

Оценку антимикробной и фунгицидной активности проводили диско-диффузионным методом [25]. Для тестирования растительных экстрактов использовали бактерии вида *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, а также грибок *Candida albicans*. Для культивирования микроорганизмов была приготовлена среда Луриа-Бертани [26]. Питательная среда готовилась в дистиллированной воде и автоклавировалась при 121 °С в течение 20 мин. Диски получали с использованием дырокола и фильтровальной бумаги, стерилизовали путем автоклавирования при 121 °С в течение 20 мин. Затем их пропитывали исследуемыми экстрактами. Экстракты тестируемых образцов фильтровали и сушили, а полученное сухое вещество растворяли в 10 % растворе диметилсульфоксида. Для каждого экстракта были подготовлены диски с конечной концентрацией 0,25, 0,5, 1 и 2 мг/диск. В качестве положительного контроля использовали стандартные диски с антибиотиком (канамицин), в качестве отрицательного контроля – диск, пропитанный 10 % раствором диметилсульфоксида. Подготовленная

суспензия микроорганизмов с оптической плотностью 0,5 по стандарту McFarland равномерно распределялась по поверхности среды с помощью стерильного шпателя Дригальского [25]. Через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды нанесли ранее подготовленные диски. Через 15 мин чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 35 °С в течение 6 ч. После окончания инкубации проводили измерение зон подавления роста вокруг дисков.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 23. Для проверки на нормальность распределения выборок использовали критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения средних значений в выборках и оценки значимости различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки HSD ( $p \leq 0,05$ ). Статистические результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартного отклонения. Для оценки корреляции количественных признаков использовали коэффициент корреляции Пирсона ( $p \leq 0,05$ ).

### Результаты и их обсуждение

На модифицированной среде MS были получены три каллусные культуры, инициированные из листовых эксплантов *Hyssopus officinalis* сорта «Лекарь»: MS-2 с добавлением 2 мг/л кинетина и 3 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (рис. 1а); MS-5 с добавлением 0,8 мг/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мг/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л индолил-3-масляной кислоты (рис. 1б); MS-6 с добавлением 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 1 мг/л 2,4-Д (рис. 1с). Каллус, культивируемый на питательной среде MS-2 и MS-6 имел зеленовато-белый цвет и рыхлую консистенцию. Каллус на среде MS-5 был коричнево-зеленого цвета и имел рыхлую консистенцию. Геммогенез и ризогенез отсутствовали на всех трех каллусных культурах.

На основе индекса роста сырой и сухой биомассы были построены кривые роста каллусных культур *H. officinalis* (рис. 2). Максимальный индекс роста сырой биомассы ( $11,6 \pm 1,4$ ) на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д наблюдали на 35 день. На среде MS-5 с добавлением 0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты максимальный индекс сырой биомассы ( $10,1 \pm 1,1$ ) наблюдали на 40 день (рис. 2а).

Максимальный индекс роста сухой биомассы исследуемых каллусных культур ( $10,6 \pm 1,0$ ) зафиксировали на 40 день на среде MS-2 с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты. Для каллусных культур, культивируемых на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д и на среде MS-5 с добавлением 0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты, максимальный индекс роста установлен на 35 день культивирования –  $8,7 \pm 0,7$  и  $6,1 \pm 0,6$  соответственно (рис. 2б).

Высокий рост сырой биомассы каллусов наблюдали на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6) на 35 день культивирования (ANOVA  $F = 4,7$ ;  $p \leq 0,05$ ). Наибольший индекс роста сухой биомассы каллусов зафиксировали на среде MS с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (MS-2) на 40 день культивирования (ANOVA  $F = 37,5$ ;  $p \leq 0,001$ ). Ранее в исследованиях было показано [10, 11], что наилучший рост каллусной культуры *H. officinalis* наблюдали на среде MS, содержащей 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д и 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 или 2 мл/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты. Оптимальными питательными средами для индукции каллусогенеза были

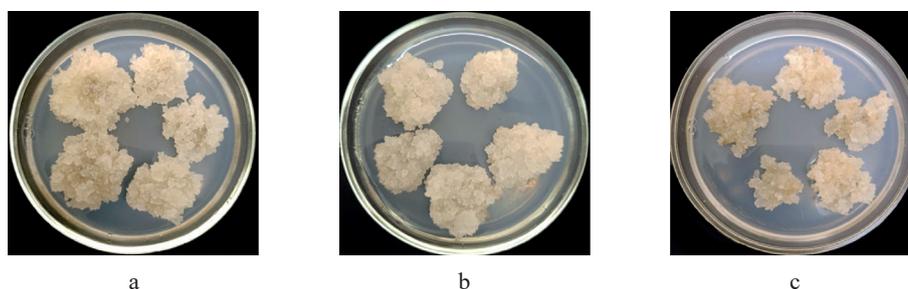


Рисунок 1. Каллусные культуры *Hyssopus officinalis* L., культивируемые на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением регуляторов роста: а – MS-2 (2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты); б – MS-5 (0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты); в – MS-6 (0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д)

Figure 1. Callus cultures of *Hyssopus officinalis* L. grown on Murashige-Skoog medium with the following growth regulators: a – MS-2 (2 ml/L kinetin and 3 ml/L  $\alpha$ -naphthylacetic acid); b – MS-5 (0.8 ml/L 6-benzylaminopurine with 1.5 ml/L 3-indoleacetic acid and 0.5 ml/L indole-3-butyric acid); c – MS-6 (0.2 ml/L 6-benzylaminopurine and 1 ml/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

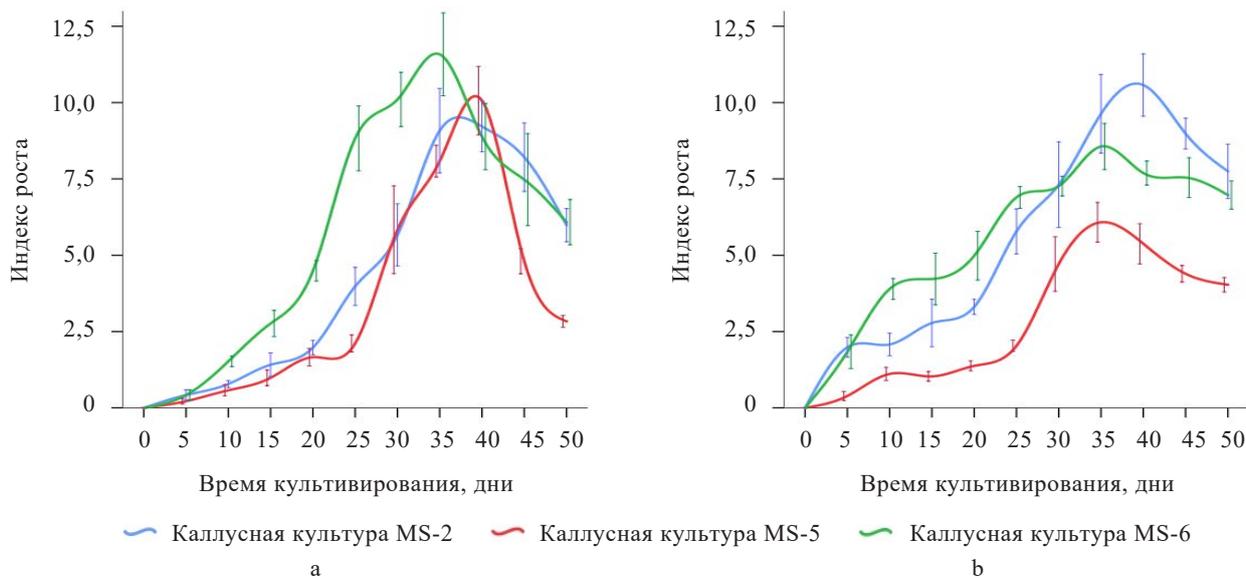


Рисунок 2. Кривые роста каллусных культур *Hyssopus officinalis* L. на основании прироста сырой (а) и сухой (б) биомассы: MS-2 – 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты; MS-5 – 0,8 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1,5 мл/л 3-индолилуксусной кислоты и 0,5 мл/л индолил-3-масляной кислоты; MS-6 – 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д

Figure 2. Growth curves for *Hyssopus officinalis* L. callus cultures based on the increase in raw (a) and dry (b) biomass: MS-2 – 2 mL/L kinetin and 3 mL/L  $\alpha$ -naphthylacetic acid; MS-5 – 0.8 mL/L 6-benzylaminopurine with 1.5 mL/L 3-indoleacetic acid and 0.5 mL/L indole-3-butyric acid; MS-6 – 0.2 mL/L 6-benzylaminopurine and 1 mL/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

среда MSc добавлением 1 мг/л индолил-3-масляной кислоты и среда, содержащая 0,5 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты, 0,1 мг/л кинетина и 1 мг/л 6-бензиламинопурина [12]. Можно сделать вывод, что рост каллусной культуры *H. officinalis* наиболее эффективен с добавлением в среду таких регуляторов роста, как 6-бензиламинопурина, 2,4-Д и  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота.

Фенольные соединения и флавоноиды являются антиоксидантами, считаются перспективными антибиотическими и противогрибковыми средствами [27, 28, 29]. Среди фенольных соединений *H. officinalis* преобладают гидроксикоричные кислоты, содержание которых составляет 72,5 % от суммы фенольных соединений [1]. Фенольные соединения включают в себя танины [30, 31]. В данном исследовании мы сравнивали суммарное содержание фенольных соединений, флавоноидов, танинов и гидроксикоричных кислот в изучаемых каллусных культурах, в культурах микрорастений *in vitro*, в коммерческом препарате и в нативном растении *H. officinalis*.

Выявили различия в содержании фенольных соединений (ANOVA,  $F = 96,7$ ;  $p \leq 0,001$ ). Высокое содержание фенольных соединений отмечали в каллусной культуре *H. officinalis*, полученной на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д ( $35,5 \pm 1,2$  мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), что примерно в 1,5 раза больше, чем в нативном растении. Наименьшее содержание фенольных соединений зафиксировали в культурах

растений *in vitro* ( $8,5 \pm 3,9$  мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) (рис. 3).

Анализ общего содержания флавоноидов в исследуемом растительном материале *H. officinalis* показал статистически значимые различия (ANOVA,  $F = 105,4$ ;  $p \leq 0,001$ ) (рис. 4). Наибольшее содержание флавоноидов обнаружили в культурах растений *H. officinalis* выращиваемых *in vitro* на питательной среде MS без использования регуляторов роста ( $5,6 \pm 0,8$  мг-экв. рутина/г сухой массы). В каллусных культурах, нативном растении и коммерческом продукте содержание флавоноидов в 4–7 раз ниже по сравнению с растениями, выращиваемыми *in vitro*. В другом исследовании количественное содержание флавоноидов в нативном растении было определено как  $1,300 \pm 0,001$  мг/г, что сопоставимо с их содержанием в нашем экстракте коммерческого препарата ( $1,3 \pm 0,5$  мг-экв. рутина/г сухой массы), выше, чем в каллусных культурах, а также ниже, чем в экстракте растения *H. officinalis*, культивируемого *in vitro* ( $2,9 \pm 2,7$  мг-экв. рутина/г сухой массы) [1].

Анализ суммы гидроксикоричных кислот показал статистически значимые различия (ANOVA,  $F = 1547$ ;  $p \leq 0,001$ ). Наибольшее содержание гидроксикоричных кислот зафиксировали в экстракте каллусной культуры *H. officinalis* на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д ( $82,5 \pm 2,6$  мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы). Низкое содержание гидроксикоричных кислот

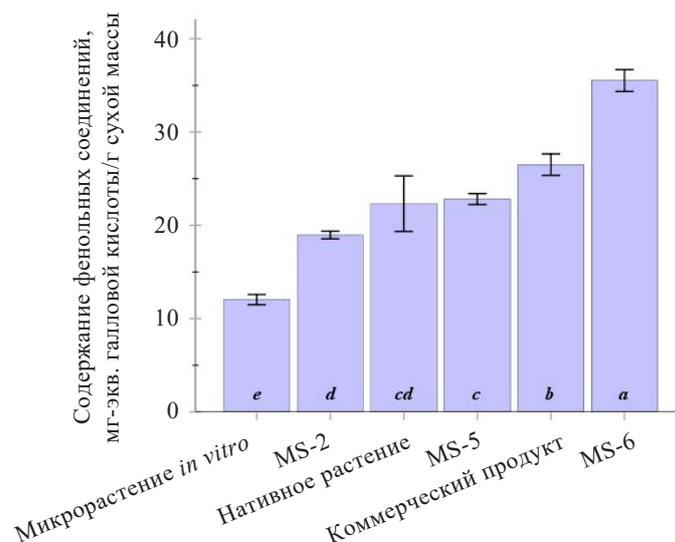


Рисунок 3. Общее содержание фенольных соединений в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L.

Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,001$ )

Figure 3. Total phenols in various *Hyssopus officinalis* materials L. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.001$ )

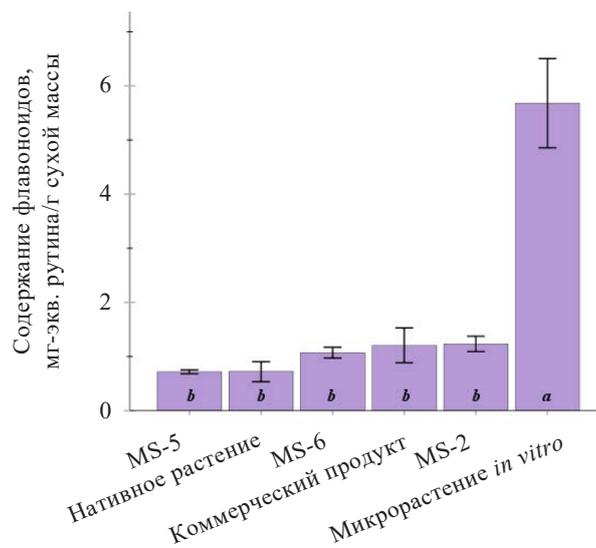


Рисунок 4. Общее содержание флавоноидов в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L.

Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,001$ )

Figure 4. Total flavonoids in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.001$ )

выявили для микрорастений, культивируемых на среде MS без добавления регуляторов роста ( $26,7 \pm 0,9$  мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы) и для нативного растения *H. officinalis* ( $24,1 \pm 0,9$  мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы) (рис. 5).

Результаты исследования общего содержания танинов в экстрактах *H. officinalis* показали значимые различия (ANOVA,  $F = 956$ ;  $p \leq 0,001$ ). Наибольшее содержание танинов зафиксировали в каллусной куль-

туре *H. officinalis*, культивируемой на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д ( $49,6 \pm 0,8$  мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы). Наименьшее содержание танинов наблюдали в каллусной культуре MS-2 с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой ( $20,3 \pm 0,6$  мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) и в растении *in vitro* ( $20,1 \pm 0,5$  мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы) (рис. 6).

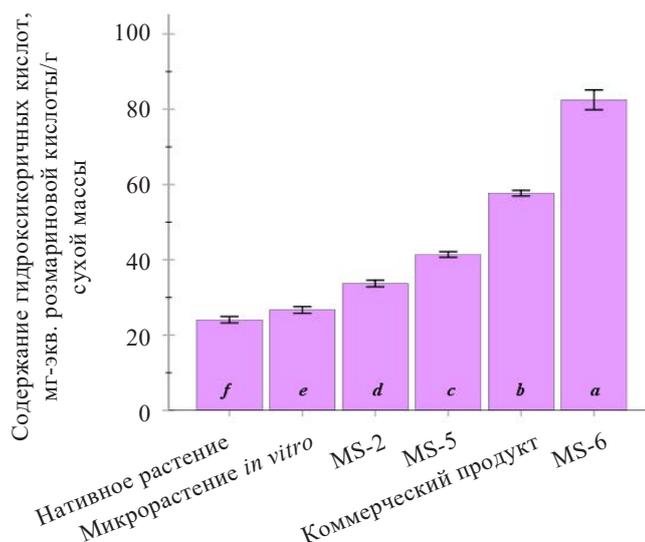


Рисунок 5. Общее содержание гидроксицинических кислот в исследованном растительном материале *Hyssopus officinalis* L.

Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,001$ )

Figure 5. Total hydroxycinnamic acids in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.001$ )

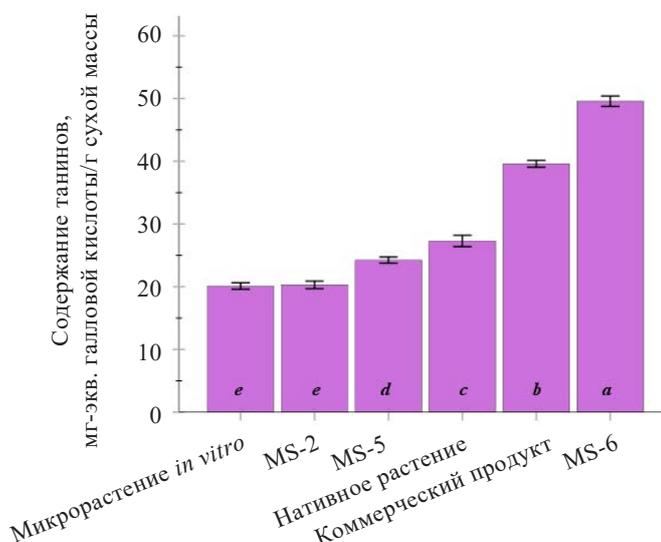


Рисунок 6. Общее содержание танина в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L.

Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,001$ )

Figure 6. Total tannins in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.001$ )

Анализ исследуемых экстрактов *H. officinalis* на содержание отдельных фенольных соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии показал наличие розмариновой, кафтаровой, кофейной и цикориевой кислот (табл. 2). Экстракты растения, культивируемого *in vitro* на среде MS без регуляторов роста, содержали флавоны: цинарозид

( $1,20 \pm 0,36$  мг/г сухой массы) и космосин ( $0,48 \pm 0,05$  мг/г сухой массы).

Высокое содержание (ANOVA,  $F = 310$ ;  $p \leq 0,001$ ) кофейной кислоты ( $1,48 \pm 0,08$  мг/г сухой массы) отмечали в каллусной культуре MS-6, культивируемой на среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д, и в микрорастении

Таблица 2. Содержание отдельных фенольных кислот и флавоноидов в исследуемом растительном материале *Hyssopus officinalis* L. (n = 3)

Table 2. Phenolic acids and flavonoids in various *Hyssopus officinalis* L. materials. (n = 3)

Растительный материал	Содержание отдельных фенольных соединений, мг/г сухой массы					
	Розмариновая кислота	Кофейная кислота	Кафтаровая кислота	Цикориевая кислота	Цинарозид	Космосин
MS-2	7,23 ± 1,12 <sup>c</sup>	0,52 ± 0,03 <sup>b</sup>	–	0,18 ± 0,04 <sup>b</sup>	–	–
MS-5	13,00 ± 1,96 <sup>b</sup>	0,42 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>b</sup>	–	–
MS-6	20,25 ± 1,84 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>b</sup>	–	–
Микрорастение <i>in vitro</i>	2,95 ± 0,59 <sup>d</sup>	1,44 ± 0,10 <sup>a</sup>	–	–	1,20 ± 0,36	0,48 ± 0,05
Нативное растение	12,46 ± 1,18 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>c</sup>	–	0,30 ± 0,04 <sup>a</sup>	–	–
Коммерческий продукт	10,30 ± 1,42 <sup>bc</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>c</sup>	–	0,15 ± 0,03 <sup>b</sup>	–	–

Примечание: Статистические результаты представлены в виде среднего ± стандартного отклонения. Разные буквы указывают на статистически значимые различия между растительным материалом для каждого соединения (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,05$ ); «–» – концентрации ниже предела обнаружения.

Note: Statistical results are presented as mean ± standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences between the plant materials for each compound (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.05$ ); concentrations below limit of detection are marked with “–”.

*in vitro* (1,44 ± 0,10 мг/г сухой массы). Низкое содержание кофейной кислоты выявили в нативном растении (0,22 ± 0,01 мг/г сухой массы) и в коммерческом продукте (0,26 ± 0,01 мг/г сухой массы).

Ранее сообщалось, что доминирующим компонентом в *H. officinalis* является розмариновая кислота (169,2 ± 0,6 мг на 100 г), обладающая антиоксидантными, антибактериальными и противовирусными свойствами [1]. Наши данные показывают, что наибольшее статистически значимое (ANOVA,  $F = 50,3$ ;  $p \leq 0,001$ ) содержание розмариновой кислоты (20,25 ± 1,84 мг/г сухой массы) выявили в каллусной культуре, культивируемой на среде MS-6 с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д. В свою очередь наименьшее содержание розмариновой кислоты обнаружили в растении, культивируемом *in vitro* (2,95 ± 0,59 мг/г сухой массы).

Высокое содержание цикориевой кислоты выявили в нативном растении (0,29 ± 0,02 мг/г сухой массы), во всех остальных растительных объектах содержание цикориевой кислоты было меньше. В микрорастении *in vitro* цикориевая кислота отсутствовала. Кафтаровая кислота была обнаружена в каллусных культурах MS-5 (0,11 ± 0,02 мг/г сухой массы) и MS-6 (0,10 ± 0,02 мг/г сухой массы).

В нашем предыдущем исследовании было установлено, что среда MS, дополненная 2 мг/л кинетина в сочетании с 3 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты, приводила к наибольшему выходу вторичных метаболитов, в частности флавоноидов, полифенольных соединений, и отмечалось, что  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота может эффективно продуцировать вторичные метаболиты [16]. По данным настоящего исследования каллусная культура, выращенная на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6), продемонстрировала высокий

выход фенольных соединений (35,5 ± 1,2 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), гидроксикоричных кислот (82,5 ± 2,6 мг-экв. розмариновой кислоты/г сухой массы), танинов (49,6 ± 0,8 мг-экв. галловой кислоты/г сухой массы), а также наибольшее содержание розмариновой (20,25 ± 1,84 мг/г сухой массы) и кофейной (1,48 ± 0,08 мг/г сухой массы) кислот.

В результате анализа антиоксидантной активности исследуемых экстрактов *H. officinalis* методом DPPH установлено наличие значимых различий (ANOVA,  $F = 252$ ;  $p \leq 0,001$ ) (рис. 7). Наибольшей антиоксидантной активностью (127,8 ± 5,6 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) обладали экстракты каллусных культур MS-6, культивируемые на питательной среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д. Наименьшая антиоксидантная активность (12,9 ± 1,5 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) обнаружена в экстрактах каллусных культур MS-2 с добавлением 2 мл/л кинетина в сочетании с 3 мл/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты.

Анализ антиоксидантной активности исследуемых экстрактов *H. officinalis* методом FRAP показал наличие значимых различий (ANOVA,  $F = 27,6$ ;  $p \leq 0,001$ ) (рис. 8). Наибольшей антиоксидантной активностью (15,9 ± 1,3 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы) обладали экстракты каллусных культур MS-6. Экстракты нативного растения и микрорастений *in vitro* проявляли наименьшую антиоксидантную активность (8,6 ± 0,6 и 9,1 ± 0,9 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы).

В процессе анализа антиоксидантной активности исследуемых экстрактов *H. officinalis* методом ABTS установили наличие значимых различий (ANOVA,  $F = 105$ ;  $p \leq 0,001$ ) (рис. 9). Наибольшую антиоксидантную активность выявили у экстрактов растений *in vitro* (90,4 ± 12,3 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой

массы) и у экстрактов, полученных из коммерческого препарата *H. officinalis* (78,6 ± 5,1 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы). Наименьшую антиоксидантную активность установили в экстрактах нативного растения (11,1 ± 0,5 мг-экв. аскорбиновой кислоты/г сухой массы).

Во многих исследованиях сообщали о высокой антиоксидантной активности *H. officinalis* [4, 32]. Наши данные по исследованию антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур, микрорастений *in vitro*, коммерческого препарата и нативного растения *H. officinalis* подтвердили это. Согласно

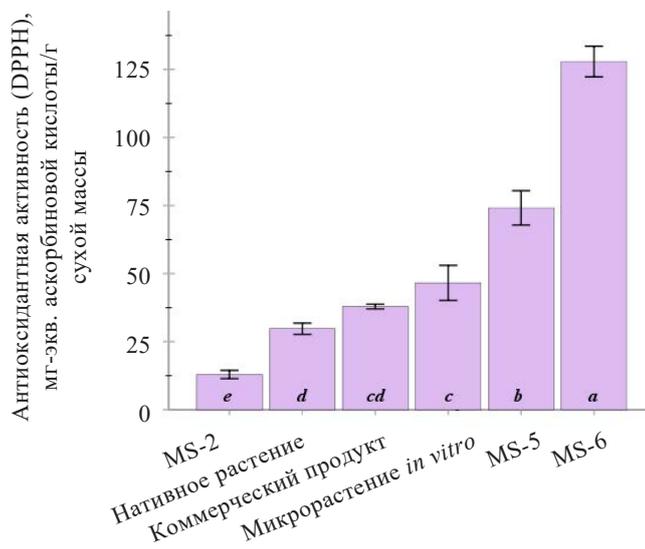


Рисунок 7. Антиоксидантная активность экстрактов в исследуемом растительном сырье *Hyssopus officinalis* L.

Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,001$ ). DPPH – антиоксидантная активность, определяемая методом анализа 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила

Figure 7. Antioxidant activity of extracts in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey’s HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.001$ ). DPPH means antioxidant activity determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay

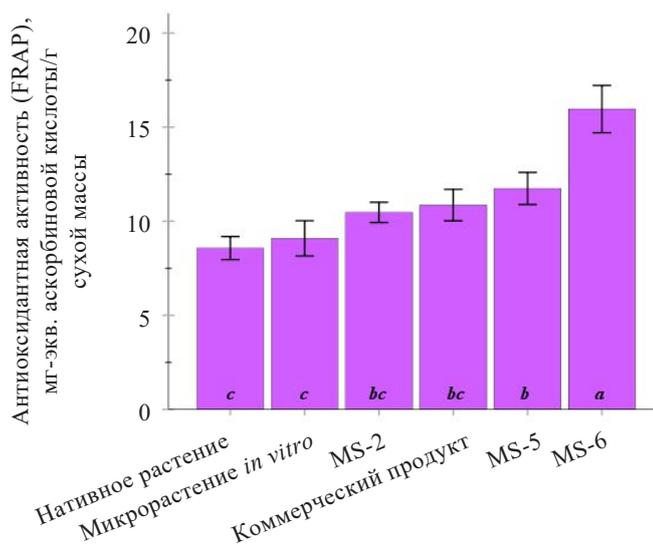


Рисунок 8. Антиоксидантная активность экстрактов в исследуемом растительном сырье *Hyssopus officinalis* L.

Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,001$ ). FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная активность

Figure 8. Antioxidant activity of extracts in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey’s HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.001$ ). FRAP means iron-reducing antioxidant activity

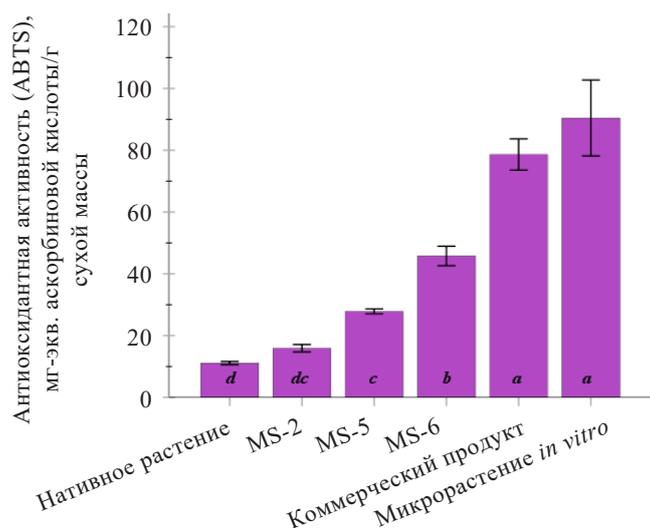


Рисунок 9. Антиоксидантная активность экстрактов в исследуемом растительном сырье *Hyssopus officinalis* L.

Примечание: разные буквы указывают на статистически значимые различия (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки,  $p \leq 0,001$ ). ABTS – антиоксидантная активность, определяемая методом анализа 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)

Figure 9. Antioxidant activity of extracts in various *Hyssopus officinalis* L. materials. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with the Tukey's HSD *post hoc* test,  $p \leq 0.001$ ). ABTS means antioxidant activity determined by the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay

анализу DPPH и FRAP, самой высокой антиоксидантной активностью обладала каллусная культура, выращенная на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6). Однако по методу ABTS наибольшую антиоксидантную активность выявили у экстрактов микрорастений *in vitro* и у экстрактов, полученных из коммерческого препарата *H. officinalis*.

На основе нормализованных значений изученных фитохимических показателей была построена тепловая карта с кластерным анализом (рис. 10). Для построения использовали такие показатели, как содержание фенольных соединений, флавоноидов, танинов и гидроксикоричных кислот, антиоксидантная активность экстрактов растительного материала *H. officinalis* (с использованием методов DPPH, FRAP и ABTS). Для построения тепловой карты было учтено содержание розмариновой, кофейной и цикориевой кислот, выявленных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии во всех образцах растительного сырья *H. officinalis* (табл. 2).

Дендрограмма, представленная на рисунке 10, демонстрирует, что все изучаемые параметры можно разделить на два основных кластера. Первый кластер включает общие фенольные соединения, розмариновую кислоту, танины, гидроксикоричные кислоты, антиоксидантную активность (DPPH и FRAP) и цикориевую кислоту. Второй кластер включает суммарное содержание флавоноидов, антиоксидантную активность (ABTS) и кофейную кислоту.

Изученные образцы растительного материала *H. officinalis* были разделены на два кластера (рис. 10). На дендрограмме видно, что в обособленный кластер выделена каллусная культура MS-6, полученная на среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д, характеризующаяся высоким содержанием большинства групп изученных фенольных соединений и антиоксидантной активностью экстрактов. Во втором кластере можно заметить обособленность микрорастений *in vitro*, образующих отдельную подгруппу внутри этого кластера. Ее положение обусловлено высоким содержанием суммарных флавоноидов, кофейной кислоты и антиоксидантной активностью экстрактов, определенной по методу ABTS.

В результате корреляционного анализа была установлена связь между содержанием фенольных соединений, танинов, гидроксикоричных кислот, розмариновой кислоты и антиоксидантной активностью (DPPH и FRAP) экстрактов (рис. 11). Между этими параметрами коэффициенты корреляции составили 0,70–0,91 ( $p \leq 0,01$ ).

Высокую отрицательную корреляцию зафиксировали между содержанием флавоноидов и фенольных соединений ( $r = -0,73$ ,  $p \leq 0,01$ ). Установили среднюю отрицательную корреляцию между содержанием флавоноидов и розмариновой кислотой ( $r = -0,65$ ;  $p \leq 0,01$ ) и среднюю положительную корреляцию между содержанием флавоноидов и антиоксидантной активностью, определенной методом ABTS ( $r = 0,62$ ;  $p \leq 0,01$ ).

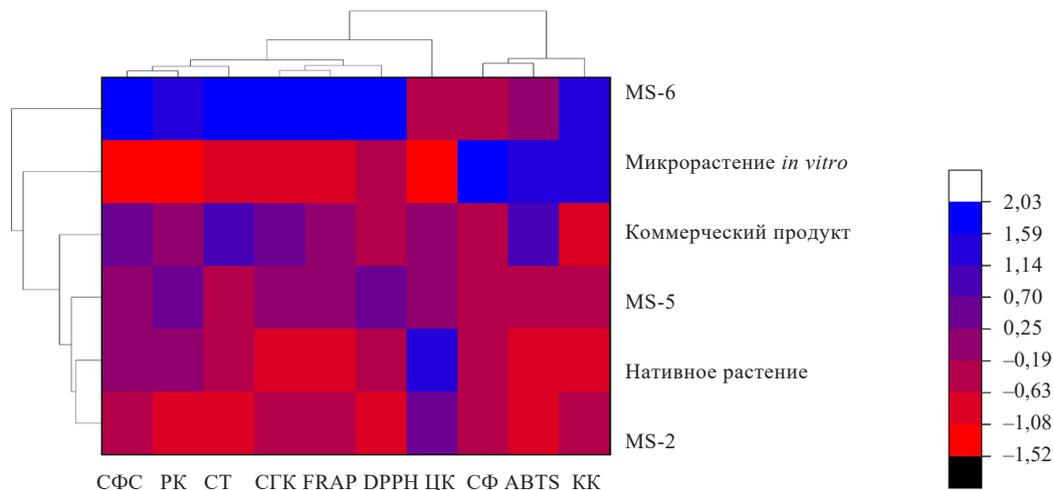


Рисунок 10. Тепловая карта с кластерами изученных фитохимических показателей (внизу) и растительного материала *Hyssopus officinalis* L. (справа). СФС – содержание фенольных соединений; РК – розмариновая кислота; СТ – содержание танинов; SGK – содержание гидроксикоричных кислот; FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная активность; DPPH – антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); ЦК – цикориевая кислота; СФ – общее содержание флавоноидов; ABTS – антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)); КК – кофейная кислота

Figure 10. Heat map with clusters of phytochemical parameters (down) and *Hyssopus officinalis* L. materials (right). СФС – phenolic compounds; РК – Rosmarinic acid; СТ – Tannins; SGK – Hydroxycinnamic acid; FRAP – Iron-reducing antioxidant activity; DPPH – Antioxidant activity by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); ЦК – Chicoric acid; СФ – Total flavonoid content; ABTS – Antioxidant activity by ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)); КК – Caffeic acid

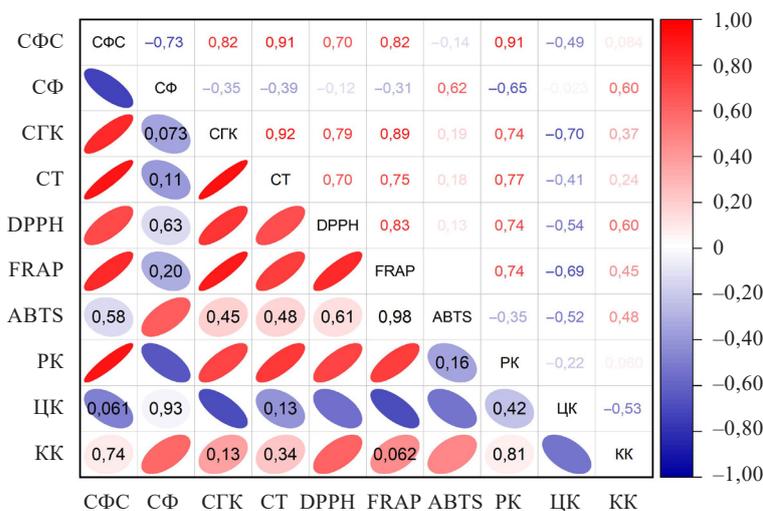


Рисунок 11. Корреляционная матрица изученных фитохимических показателей *Hyssopus officinalis* L. В верхней правой части представлены коэффициенты корреляции Пирсона ( $-1 \leq r \leq 1$ ); в левой нижней части красные или синие овалы обозначают значимость корреляций – кружки без меток обозначают значимые корреляции ( $p \leq 0,05$ ); в остальных кружках или ячейках представлен уровень значимости корреляций ( $p > 0,05$ ). СФС – содержание фенольных соединений; СФ – содержание флавоноидов; SGK – содержание гидроксикоричных кислот; СТ – содержание танинов; DPPH – антиоксидантная активность, определяемая методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил); FRAP – железовосстанавливающая антиоксидантная активность; ABTS – антиоксидантная активность, определяемая методом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)); РК – розмариновая кислота; ЦК – цикориевая кислота; КК – кофейная кислота

Figure 11. Correlation matrix for phytochemical parameters of *Hyssopus officinalis* L. The upper right part presents the Pearson's correlation coefficients ( $-1 \leq r \leq 1$ ); the red or blue ovals in the bottom left part indicate the significance of the correlations while the unmarked circles indicate significant correlations ( $p \leq 0.05$ ); the remaining circles or cells represent the significance level of the correlations ( $p > 0.05$ ). СФС – Phenolic compounds; СФ – Flavonoids; SGK – Hydroxycinnamic acids; СТ – Tannins; DPPH – Antioxidant activity by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); FRAP – Iron-reducing antioxidant activity; ABTS – Antioxidant activity by ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)); РК – Rosmarinic acid; ЦК – Chicoric acid; КК – Caffeic acid

Общее содержание танинов в экстрактах *H. officinalis* показало высокий уровень корреляции с общим содержанием гидроксикоричных кислот ( $r = 0,92$ ;  $p \leq 0,01$ ), с содержанием розмариновой кислоты ( $r = 0,77$ ;  $p \leq 0,01$ ) и антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP ( $r = 0,75$ ;  $p \leq 0,01$ ). Установили среднюю положительную корреляцию между содержанием танинов и антиоксидантной активностью экстрактов, определенной методом DPPH ( $r = 0,70$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Установили сильную положительную корреляцию с общим содержанием гидроксикоричных кислот и антиоксидантной активностью, определенной методами DPPH ( $r = 0,79$ ;  $p \leq 0,01$ ) и FRAP ( $r = 0,89$ ;  $p \leq 0,01$ ), а также среднюю отрицательную корреляцию с содержанием цикориевой кислоты ( $r = -0,70$ ;  $p \leq 0,01$ ).

Антиоксидантная активность, определенная методом DPPH, показала высокую положительную корреляцию с антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP ( $r = 0,83$ ;  $p \leq 0,01$ ), с содержанием розмариновой кислоты ( $r = 0,74$ ;  $p \leq 0,01$ ) и среднюю положительную корреляцию с содержанием кофейной кислоты ( $r = 0,60$ ;  $p \leq 0,01$ ), среднюю отрицательную корреляцию с содержанием цикориевой кислоты

( $r = -0,54$ ;  $p \leq 0,01$ ). Высокую положительную корреляцию установили между антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP, и содержанием розмариновой кислоты ( $r = 0,74$ ;  $p \leq 0,01$ ). Общее содержание цикориевой кислоты показало среднюю отрицательную корреляцию с антиоксидантной активностью, определенной методом FRAP ( $r = -0,69$ ;  $p \leq 0,01$ ), определенной методом ABTS ( $r = -0,52$ ;  $p \leq 0,05$ ), и с содержанием кофейной кислоты ( $r = 0,53$ ;  $p \leq 0,05$ ).

В ходе нашего исследования была показана тесная связь антиоксидантной активности исследуемых экстрактов, определенных методом DPPH и FRAP с содержанием фенольных соединений, танинов, гидроксикоричных кислот, розмариновой и цикориевой кислотами. Установили связь между антиоксидантной активностью экстрактов, определенной методом ABTS и содержанием флавоноидов, кофейной кислоты. Наиболее перспективной каллусной культурой *H. officinalis* является каллусная культура, культивируемая на среде MS с добавлением 2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д (MS-6), которая характеризуется максимальной антиоксидантной активностью по методу DPPH и FRAP.

Таблица 3. Антибактериальная и фунгицидная активность экстрактов исследуемого растительного материала *Hyssopus officinalis* L. (зоны ингибирования включают диаметр диска 6 мм)

Table 3. Antibacterial and fungicidal activity of *Hyssopus officinalis* L. extracts with inhibition zones included in disk diameter (6 mm)

Растительный материал	Диаметр зоны ингибирования, мм					
	Канамицин, 50 мкг/диск	10 % диметилсульфоксида, 20 мкг/диск	Концентрация экстракта, мг/диск			
			0,25	0,50	1,00	2,00
<i>Escherichia coli</i>						
MS-2	21,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-5	21,3 ± 0,9	–	–	–	–	–
MS-6	19,3 ± 0,9	–	–	7,0 ± 0,3	–	7,3 ± 0,1
Микрорастение <i>in vitro</i>	18,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
Коммерческий продукт	18,3 ± 1,4	–	–	–	–	–
Нативное растение	19,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
<i>Bacillus subtilis</i>						
MS-2	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-5	20,7 ± 1,3	–	–	–	–	–
MS-6	19,3 ± 0,9	–	–	–	–	7,2 ± 0,2
Микрорастение <i>in vitro</i>	19,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
Коммерческий продукт	22,0 ± 1,0	–	–	–	–	–
Нативное растение	21,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i>						
MS-2	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-5	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	–
MS-6	22,0 ± 0,6	–	–	–	–	7,0 ± 0,2
Микрорастение <i>in vitro</i>	18,3 ± 0,9	–	–	–	–	–
Коммерческий продукт	21,3 ± 0,3	–	–	–	–	–
Нативное растение	20,0 ± 0,6	–	–	–	–	–

Примечание: «–» – зоны ингибирования не наблюдалось.

Note: “–” – means that no inhibition zone was detected.

В настоящем исследовании изучили антибактериальную и фунгицидную активность экстрактов растительного материала *H. officinalis* в отношении представителя граммотрицательных бактерий *Escherichia coli*, представителя грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* и сапротрофного дрожжеподобного гриба *Candida albicans* (табл. 3). Из всех исследуемых экстрактов очень слабая антибактериальная и фунгицидная активность против тестируемых микроорганизмов была обнаружена у экстракта каллусной культуры MS-6, культивируемого на среде MS с добавлением 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д. При дозе экстракта каллусной культуры MS-6 1,0 и 2,0 мг/диск проявлялся некоторый антибактериальный эффект с незначительной активностью в отношении *E. coli* – диаметр зоны ингибирования  $7,0 \pm 0,3$  и  $7,3 \pm 0,1$  мм соответственно. Экстракт каллусной культуры MS-6 при дозе 2,0 мг/диск проявил очень слабое ингибирующее действие против *B. subtilis* и *C. albicans* – диаметр зоны ингибирования  $7,2 \pm 0,2$  и  $7,0 \pm 0,2$  мм соответственно. В исследовании по изучению антибактериальной активности экстрактов *H. officinalis* были показаны значительные ингибирующие эффекты на *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* и *E. coli* в концентрации 200 и 400 мг/мл [2]. Кроме того, был продемонстрирован ингибирующий эффект против грибов [4].

### Выводы

Результаты исследования показали, что каллусная культура *Hyssopus officinalis* L., культивируемая на питательной среде Мурасиге-Скуга с 0,2 мл/л 6-бензиламинопурина в сочетании с 1 мл/л 2,4-Д, по сравнению с остальными объектами исследования, характеризуется высоким содержанием веществ фенольной природы, обладает выраженной антиоксидантной актив-

ностью и слабой антимикробной активностью. Исследуемые экстракты каллусных культур, микрорастений *H. officinalis*, культивируемых *in vitro*, в сравнении с экстрактом нативного растения показали количественно наилучший выход основных вторичных метаболитов. Это доказывает, что биотехнологический метод получения из растений важных соединений с применением клеточных культур является перспективным. Однако требуется дальнейшее изучение каллусных культур *H. officinalis* с целью повышения биосинтеза биологически активных веществ.

### Критерии авторства

А. В. Пунгин, Е. А. Попова – концептуализация исследования, обработка результатов, подготовка и редактирование статьи. А. В. Пунгин, О. В. Кроть – методология. Е. А. Попова, А. П. Пантюхина, О. В. Кроть – проведение экспериментальных исследований. Все авторы ознакомились и согласились с опубликованной версией рукописи.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Contribution

A.V. Pungin and E.A. Popova developed the research concept, processed the results, and drafted the manuscript. A.V. Pungin and O.V. Krol designed the research methodology. E.A. Popova, A.P. Pantyukhina, and O.V. Krol conducted the experimental research. All the authors approved of the final version of the manuscript.

### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

### References/Список литературы

1. Kumar V, Kaur N, Kaur A, Wadhwa P. Phytochemistry and Pharmacology of Indian Traditional Plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.): A Review. The Natural Products Journal. 2023;13(4):e110822207418. <https://doi.org/10.2174/2210315512666220811153919>
2. Sayyahi J, Mobaiyen H, Jafari B, Jafari-Sales A. Antibacterial effects of methanolic extracts of *Reum ribes* L. and *Hyssopus officinalis* on some standard pathogenic bacteria. Jorjani Biomedicine Journal. 2019;7(3):34–44. <https://doi.org/10.29252/jorjanibiomedj.7.3.34>
3. Judžentienė A. Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Oils. In: Preedy VR, editor. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press; 2016. pp. 471–479. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00053-5>
4. Tahir M, Khushtar M, Fahad M, Rahman MA. Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant *Hyssop* (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2018;8(7):132–140. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8721>
5. Zayova E, Geneva M, Stancheva I, Dimitrova L, Petrova M, Hristozkova M, et al. Evaluation of the antioxidant potential of *in vitro* propagated hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) with different plant growth regulators. International Journal of Phytomedicines and Related Industries. 2018;10(4):295–304. <https://doi.org/10.5958/09756892.2018.00044.8>
6. Borrelli F, Pagano E, Formisano C, Piccolella S, Fiorentino A, Tenore GC, et al. *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*: An unexploited wild-growing crop for new disclosed bioactives. Industrial Crops and Products. 2019;140:111594. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111594>

7. Ozyigit II, Dogan I, Hocaoglu-Ozyigit A, Yalcin B, Erdogan A, Yalcin IE, *et al.* Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 2023;14:1132555. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>
8. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*. 2019;5(1):50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
9. Bulavin IV, Ivanova NN, Mitrofanova IV. *In vitro* regeneration of *Hyssopus officinalis* L. and plant genetic similarity. *Doklady Biological Sciences*. 2021;499:109–112. <https://doi.org/10.1134/S0012496621040013>
10. Soheili S, Miri SM, Ghazijahani N. Callus Induction from *In Vitro* Cultured Leaf, Hypocotyl and Root of *Hyssopus officinalis*. In *The First National Conference on the Application of Advanced Chemical and Agricultural Research for Development of Medicinal Plants*; 2021.
11. Morovati S, Zebarjadi A, Bahraminejad S, Nadhaphy A. Effect of plant growth regulators on callogenesis and regeneration of *Hyssopus officinalis* in *in vitro* conditions. *Agricultural Biotechnology Journal*. 2021;13(3):187–204. <https://doi.org/10.22103/jab.2021.16756.1277>
12. Maslova E, Gulya N, Perelugina T, Semykina V, Kalashnikova E. Introduction of *Hyssopus officinalis* L. into *in vitro* culture to optimize the conditions for obtaining callus tissues and microclonal propagation as a promising method of innovative agrobiotechnologies BIO Web of Conferences. 2021;30:05006. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213005006>
13. Skrzypek Z, Wysokińska H. Sterols and triterpenes in cell culture of *Hyssopus officinalis* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2003;58(5–6):308–312. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-5-602>
14. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
15. Sadat-Hosseini M, Soleimani A. Callus Induction, Shoot and Root Regeneration in *Hyssopus officinalis* using Sodium Nitroprusside and Plant Growth Regulators. *Journal of Medicinal plants and By-product*. 2023. <https://doi.org/10.22034/JMPB.2023.363600.1611>
16. Babich O, Sukhikh S, Pungin A, Astahova L, Chupakhin E, Belova D, *et al.* Evaluation of the Conditions for the Cultivation of Callus Cultures of *Hyssopus officinalis* Regarding the Yield of Polyphenolic Compounds. *Plants*. 2021;10(5):915. <https://doi.org/10.3390/plants10050915>
17. Bibi A, Khan MA, Adil M, Mashwani ZUR. Production of callus biomass and antioxidant secondary metabolites in black cumin. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 2018;28(5):1321–1328.
18. Padhi EMT, Liu R, Hernandez M, Tsao R, Dan Ramdath D. Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulses and their contribution to antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2017;38:602–611. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.006>
19. Sevket ALP, Ercisli S, Jurikova T, Cakir O, Gozlekci S. Bioactive Content of Rose Hips of Different Wildly Grown *Rosa dumalis* Genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2016;44(2):472–476. <https://doi.org/10.15835/nbha44210432>
20. Štefan MB, Rodríguez VJ, Blažeković B, Kindl M, Vladimir-Knežević S. Total Hydroxycinnamic Acids Assay: Prevalidation and Application on *Lamiaceae* Species. *Food Analytical Methods*. 2013;7:326–336. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9630-8>
21. Feduraev P, Skrypnik L, Nebreeva S, Dzhobadze G, Vatagina A, Kalinina E, *et al.* Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some *Rumex* Species (*Polygonaceae*). *Antioxidants*. 2022;11(2):311. <https://doi.org/10.3390/antiox11020311>
22. Skrypnik L, Grigorev N, Michailov D, Antipina M, Danilova M, Pungin A. Comparative study on radical scavenging activity and phenolic compounds content in water bark extracts of alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), oak (*Quercus robur* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.). *European Journal of Wood and Wood Products*. 2019;77:879–890. <https://doi.org/10.1007/s00107-019-01446-3>
23. Skrypnik L, Feduraev P, Golovin A, Maslennikov P, Belov N, Matveev M, *et al.* Biotechnological Potential of Different Organs of Mistletoe (*Viscum album* L.) Collected from Various Host Tree Species in an Urban Area. *Plants*. 2022;11(20):2686. <https://doi.org/10.3390/plants11202686>
24. Milentyeva IS, Fedorova AM, Larichev TA, Altshuler OG. Biologically active compounds in *Scutellaria baicalensis* L. callus extract: Phytochemical analysis and isolation. *Foods and Raw Materials*. 2023;11(1):172–186. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-564>
25. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010;81(2):121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
26. Bertani G. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(3):595–600. <https://doi.org/10.1128/jb.186.3.595-600.2004>

27. Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018;248:1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
28. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*. 2018;5(3):93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
29. Milentyeva IS, Vesnina AD, Fedorova AM, Ostapova EV, Larichev TA. Chlorogenic Acid and Biohanin A from *Trifolium pratense* L. Callus Culture Extract: Functional Activity *In Vivo*. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(4):754–765. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2475>; <https://elibrary.ru/GGYCQG>
30. Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants–Natural Health Products for Human Health. *Molecules*. 2023;28(4):1845. <https://doi.org/10.3390/molecules28041845>
31. Pizzi A. Tannins: Prospectives and Actual Industrial Applications. *Biomolecules*. 2019;9(8):344. <https://doi.org/10.3390/biom9080344>
32. Sharifi-Rad J, Quispe C, Kumar M, Akram M, Amin M, Iqbal M, et al. *Hyssopus* Essential Oil: An Update of Its Phytochemistry, Biological Activities, and Safety Profile. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022; 2022(1):8442734. <https://doi.org/10.1155/2022/8442734>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2535>  
<https://elibrary.ru/OAEYOJ>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Оценка *in vivo* биологических эффектов нового кисломолочного продукта на основе кобыльего молока



Е. С. Симоненко<sup>1</sup>, С. В. Симоненко<sup>1,\*</sup>,  
А. В. Бегунова<sup>1</sup>, А. Н. Петров<sup>2</sup>, Е. С. Семенова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт детского питания, Истра, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности , Москва, Россия

Поступила в редакцию: 29.02.2024

Принята после рецензирования: 15.04.2024

Принята к публикации: 07.05.2024

\*С. В. Симоненко: [nir@niidp.ru](mailto:nir@niidp.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-6999-5048>

Е. С. Симоненко: <https://orcid.org/0000-0002-2878-8069>

А. В. Бегунова: <https://orcid.org/0000-0002-5360-8955>

А. Н. Петров: <https://orcid.org/0000-0001-9879-482X>

Е. С. Семенова: <https://orcid.org/0000-0003-3848-7478>

© Е. С. Симоненко, С. В. Симоненко, А. В. Бегунова,  
А. Н. Петров, Е. С. Семенова, 2024



### Аннотация.

Возрастающий интерес потребителей к продуктам здорового питания способствует разработке новых продуктов с функциональными свойствами. Уникальные характеристики кобыльего молока обуславливают повышенный интерес к нему и продуктам на его основе. При разработке нового продукта мы объединили кобылье молоко, коровье молоко, молочнокислые и пробиотические микроорганизмы, чтобы получить ферментированный продукт с функциональными свойствами.

Объектами исследований являлись кисломолочные продукты на основе кобыльего, коровьего молока и их смеси. Доклинические исследования свойств разработанного продукта проводили на клинически здоровых мышах-самках C57BL/6J. Биохимические показатели плазмы крови определяли на автоматическом анализаторе BioChem FC-360. Гистологические препараты изучали на световом микроскопе AxioImager A1. Количественную оценку проводили с использованием программы ImageJ (США).

Наблюдения за животными не выявили отклонений в физиологическом состоянии. Употребление на фоне «западной» диеты кисломолочного продукта на основе кобыльего молока и смеси кобыльего и коровьего молока приводило к снижению холестерина липопротеинов низкой плотности при увеличении содержания холестерина липопротеинов высокой плотности на 25,4–30,0 %. Отмечали выравнивание снижения метаболических показателей (креатинин и мочевины) и активности аланинаминотрансферазы у мышей группы 1 и 2, что указывает на их гепатопротекторный эффект. В плазме крови мышей групп 3, 2 и 1 снижение мочевины составило 29,0, 25,7 и 19,7 %. На фоне «западной» диеты кисломолочный продукт, на основе кобыльего, смеси кобыльего и коровьего молока вызывал статистически значимое снижение количества гранулоцитов, что свидетельствует о нивелировании воспаления за счет положительного действия на микробиом.

Полученные результаты исследований демонстрируют наличие у разработанного продукта биологических эффектов, обуславливающих функциональные свойства. Необходимы дальнейшие исследования для определения возможности включения кисломолочного продукта в комплексную диету для профилактики неалкогольной жировой болезни печени.

**Ключевые слова.** Кисломолочный продукт, кобылье молоко, коровье молоко, пробиотики, биологические эффекты

**Финансирование.** Работа выполнена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания по направлению FGMF-2022-0007 «Оценка пищевого статуса детей и подростков и разработка состава, рецептур и технологий специализированных продуктов детского и геродиетического питания с использованием региональной сырьевой базы» на базе Научно-исследовательского института детского питания – филиала ФИЦ «Питания и биотехнологии» и Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН.

**Для цитирования:** Оценка *in vivo* биологических эффектов нового кисломолочного продукта на основе кобыльего молока / Е. С. Симоненко [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 675–686. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2535>

## New Functional Fermented Mare's Milk Product: Biological Assessment *in vivo*



Elena S. Simonenko<sup>1</sup>, Sergey V. Simonenko<sup>1,\*</sup>,  
Anna V. Begunova<sup>1</sup>, Andrey N. Petrov<sup>2</sup>, Elena S. Semenova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Baby Nutrition, Istra, Russia

<sup>2</sup> All-Russian Scientific Research Institute of Dairy Industry<sup>ROR</sup>, Moscow, Russia

Received: 29.02.2024  
Revised: 15.04.2024  
Accepted: 07.05.2024

\*Sergey V. Simonenko: [nir@niidp.ru](mailto:nir@niidp.ru),  
<https://orcid.org/0000-0002-6999-5048>  
Elena S. Simonenko: <https://orcid.org/0000-0002-2878-8069>  
Anna V. Begunova: <https://orcid.org/0000-0002-5360-8955>  
Andrey N. Petrov: <https://orcid.org/0000-0001-9879-482X>  
Elena S. Semenova: <https://orcid.org/0000-0003-3848-7478>

© E.S Simonenko, S.V Simonenko, A.V Begunova, A.N Petrov, E.S Semenova, 2024



### Abstract.

The growing consumer interest in healthy foods increases the demand for new functional products. Mare's milk and its products possess some unique nutritional properties. This article introduces a new fermented functional food that combines mare's milk, cow's milk, lactic acid, and probiotic microorganisms.

The research featured fermented milk products based on mare's milk, cow's milk, and their mixes. The preclinical studies involved clinically healthy female mice (C57BL/6J). The biochemical analysis of blood plasma was performed on a BioChem FC-360 automatic analyzer while the histological preparations relied on an Axiolmaiger A1 light microscope. The quantitative assessment employed the ImageJ software (USA).

The mice obtained the so-called Western diet and the experimental product. Their low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) decreased by 254-30.0% while the high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) went up. The mice that were given the experimental product demonstrated lower creatinine, urea, and alanine aminotransferase activity in the blood plasma, which indicated a certain hepatoprotective effect. The experimental product caused a statistically significant decrease in granulocytes, i.e., the microbiome had an anti-inflammatory effect on the gut microbiota, which, in its turn, affected the cytokine expression.

The new product demonstrated strong biological activity, which rendered it functional properties. Further research will determine the effect of fermented milk products as part of a comprehensive diet on non-alcoholic fatty liver disease.

**Keywords.** Fermented milk product, mare's milk, cow's milk, probiotics, biological effects

**Funding.** The work was carried out using subsidies for the implementation of the state task in the direction FGMPF-2022-0007 "Assessment of the nutritional status of children and adolescents and development of the composition, recipes and technologies of specialized products of children's and gerodietetic nutrition using the regional raw material base" on the basis of the Research Institute of Children nutrition – a branch of the Federal Research Center "Nutrition and Biotechnology" and the Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin at the Federal State Budgetary Institution "FSC Food Systems named after V.M. Gorbатов" RAS.

**For citation:** Simonenko ES, Simonenko SV, Begunova AV, Petrov AN, Semenova ES. New Functional Fermented Mare's Milk Product: Biological Assessment *in vivo*. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):675–686. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2535>

### Введение

В последние годы наблюдается возрастающий интерес потребителей к продуктам здорового питания, что, несомненно, способствует разработке и внедрению в производство новых продуктов с функциональными свойствами. Молочные продукты являются частью ежедневного рациона человека и представляют собой

важную группу продуктов питания, а кисломолочные продукты являются наиболее распространенной группой продуктов с функциональными свойствами [1]. Их полезные свойства и биологическая ценность обусловлены не только заквасочными микроорганизмами, которые продуцируют в процессе ферментации биологически активные метаболиты, но и составом исходного

сырья [2]. Кисломолочные продукты обладают потенциальными пробиотическими, антиоксидантными и противовоспалительными эффектами [3–5].

Самым популярным кисломолочным продуктом в мире является йогурт из коровьего молока. Однако из-за увеличения распространенности аллергии на коровье молоко возрастает интерес к альтернативным продуктам, особенно на основе кобыльего молока, которое обладает уникальными свойствами [6].

Кобылье молоко характеризуется высокой пищевой и биологической ценностью, обладает рядом лечебных свойств [7]. Повышенный интерес к кобыльему молоку обусловлен уникальными характеристиками этого вида молока и продуктов из него [8, 9].

Состав кобыльего молока существенно отличается от коровьего молока высокой концентрацией полиненасыщенных жирных кислот, особенно линолевой и линоленовой, более низкой концентрацией коротко- и длинноцепочечных насыщенных жирных кислот; соотношением ненасыщенных к насыщенным жирным кислотам в липидной фазе (1,3, тогда как у коровьего – 0,45); сбалансированным аминокислотным составом и высокой усвояемостью белков [10–12]. Кобылье молоко характеризуется низкими значениями показателей атерогенности и тромбогенности [7].

Использование при производстве кисломолочных продуктов на основе кобыльего молока заквасочных микроорганизмов с пробиотическими свойствами повышает их функциональный потенциал. Есть данные о биологической активности *Lactobacillus rhamnosus* NCDC17 при лечении ожирения и различных типов диабета [13]. В странах с традиционным производством кобыльего молока и кумыса их благотворное влияние на здоровье человека известно на протяжении веков, и они используются в терапии многих заболеваний [14].

В настоящее время к наиболее распространенным заболеваниям печени относят неалкогольную жировую болезнь печени. Это заболевание встречается у 20–30 % населения и выступает маркером сердечно-сосудистой патологии. Есть предположение, что между печенью и висцеральной жировой тканью, обладающей провоспалительным потенциалом, имеется патогенетическая «перекрестная связь» [15]. Эта жировая ткань секретирует различные факторы, участвующие в развитии атеросклероза и неалкогольной жировой болезни печени и др. На развитие и прогрессирование неалкогольной жировой болезни печени может влиять и измененная микробиота кишечника, которая участвует в регулировании уровня холина и желчных кислот [15]. М. Е. Dumas с соавторами обнаружили, что микробный метаболизм холина до метиламинов имитирует дефицит холина у хозяина, что приводит к неалкогольной жировой болезни печени [16]. G. Targher и др. провели метаанализ, который показал, что неалкогольная жировая болезнь печени связана с увеличением сердечно-сосудистых заболеваний [17]. Установлена тесная взаимосвязь неалкогольной жи-

рой болезни печени и сердечно-сосудистых заболеваний, не было получено доказательств того, что жировая болезнь печени служит причиной их развития. С неалкогольной жировой болезнью печени тесно связаны ожирение, диабет 2 типа, дислипидемия и метаболический синдром [18]. Этот факт диктует необходимость комплексного подхода к лечению больных с жировой болезнью печени. Основой профилактики и лечения неалкогольной жировой болезни печени является изменение образа жизни, включающее гипокалорийную диету и физические нагрузки. При недостаточной эффективности проводят медикаментозную терапию [19]. В качестве вспомогательной терапии при заболеваниях печени в мире широко применяются специализированные препараты – гепатопротекторы, а также продукты функциональной направленности с гепатопротекторными эффектами. Разработка новых продуктов функциональной направленности с доказанными биологическими эффектами является актуальной.

При разработке нового кисломолочного продукта мы объединили кобылье, коровье молоко, молочнокислые и пробиотические микроорганизмы, чтобы получить ферментированный продукт с функциональными свойствами. Настоящее исследование проведено с целью определения биологических эффектов нового кисломолочного продукта на основе кобыльего молока на мышинной модели с жировой дистрофией печени.

#### Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись образцы кисломолочных продуктов:

- кисломолочный продукт на основе кобыльего молока (образец № 1);
- кисломолочный продукт на основе кобыльего молока с добавлением коровьего молока (образец № 2);
- кисломолочный продукт на основе коровьего молока (образец № 3).

#### Схема приготовления опытных образцов кисломолочных продуктов:

- восстановление сухого молока (кобыльего и/или коровьего);
- пастеризация при температуре  $65 \pm 2$  °C в течение 30 мин;
- охлаждение до температуры заквашивания;
- внесение закваски и перемешивание;
- розлив заквашенной молочной смеси в стерильные полимерные стаканчики;
- термостатирование образцов при  $37 \pm 1$  °C до достижения активной кислотности  $4,80 \pm 0,05$  ед. рН.
- охлаждение образцов кисломолочного продукта и хранение в холодильнике при температуре  $4 \pm 2$  °C.

В кисломолочном продукте на основе кобыльего молока с добавлением коровьего содержание кобыльего молока составило 60 %, а коровьего молока – 40 %. В качестве стартовых культур использовали *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* в соотношении 1/3 и *L. rhamnosus* из

коллекции Всероссийского института молочной промышленности. Количество вносимой закваски – 7 %, из которых *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* – 1 часть, а *L. rhamnosus* – 6 частей.

Исследования по определению функциональных свойств разработанных кисломолочных продуктов проводили на базе Экспериментальной клинико-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения в «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН (г. Москва).

Исследования проведены на клинически здоровых сексуально наивных животных: 40 мышах-самках C57BL/6J, полученных из питомника ООО «Кролинфо» (Орехово-Зуевский район), случайным образом отобранных, индивидуально промаркированных и прошедших адаптацию на протяжении пяти суток, возрастом 5–6 недель и массой  $15,2 \pm 0,9$  г на начало эксперимента.

Крысы были разделены на пять групп по 8 животных в каждой:

1 группа – опытные животные, потребляющие «западную» диету (WD) и образец № 1;

2 группа – опытные животные, потребляющие WD и образец № 2;

3 группа – опытные животные, потребляющие WD и образец № 3;

4 группа – контрольные животные, потребляющие WD;

5 группа – интактные животные, потребляющие стандартный рацион вивария (KD).

Воду, экспериментальные образцы и рацион животные получали *ad libitum* посредством поилок и кормушек из нержавеющей стали. Мыши групп 1, 2, 3 и 4 получали рацион с содержанием насыщенных жиров 20 % (Western Diet, WD) – аналог D12079Bi Research Diets (США), составленный из отечественных компонентов [20]. Состав рациона приведен в таблице 1.

Животные группы 5 получали полнорационный комбикорм по ТУ 9296-002-70941247, содержащий пшеницу (40 %), ячмень (26 %), шрот соевый ( $\leq 50$  % сырого протеина), муку рыбную ( $\leq 60$  % сырого протеина), отруби пшеничные (18,0 %), масло подсолнечника (5 %), витаминно-минеральный премикс, соль поваренную (0,5 %), антиоксидант. Питательная ценность приведена в таблице 2.

При анализе потребления рациона и экспериментальных образцов выявлено, что животные группы 1 в среднем 2 суток потребляли  $2,48 \pm 0,32$  г «западной» диеты и  $5,22 \pm 1,10$  мл кисломолочного продукта образца № 1, животные группы 2 –  $2,43 \pm 0,29$  г «западной» диеты и  $4,11 \pm 1,1$  мл кисломолочного продукта образца № 2, группы 3 –  $2,16 \pm 0,15$  г «западной» диеты и  $3,42 \pm 0,58$  мл кисломолочного продукта образца 3,

Таблица 1. Состав рациона для мышей групп 1–4 (на 100 г с. в.)

Table 1. Diet for mice in groups 1–4, per 100 g solids

Ингредиент	Значение, %
Сывороточный белок 90 %	21,20
DL-метионин	0,30
Сахароза 99 %	34,00
Мальтодекстрин	10,00
Крахмал кукурузный	5,00
Целлюлоза микрокристаллическая Биоцель XL200	5,00
Лярд	19,00
Кукурузное масло пищевое нерафинированное	1,00
Монокальций фосфат	3,90
Кальций углекислый	0,40
Солевая смесь: сахароза – 43,24, калий углекислый (56 % К) – 24,00, натрий хлористый (39,3 % Na) – 14,80, калия хлорид (52,0 % К) – 8,96, магния оксид (53,0 % Mg) – 7,06, железо сернокислое 1-водное (30,0 % Fe) – 0,54, марганец сернокислый 1-водный (32,0 % Mn) – 1,00, цинка оксид (78,0 % Zn) – 0,22, хром сернокислый (17,0 % Cr) – 0,034, медь сернокислая 5-водная (24,5 % Cu) – 0,136, кальция йодат (61,5 % I) – 0,002, натрий селенисто-кислый (45,6 % Se) – 0,002	0,24
Витамин В <sub>4</sub> 70 %	0,20
Смесь витаминов: сахароза – 80,22, витамин Е ацетат 50 % – 10,00; никотинамид (ниацин) 99 % – 3,00, биотин (Н) микровит 2 % – 1,00, пантотонат кальция (В <sub>3</sub> ) кальпан микровит 98 % – 1,60, витамин D <sub>3</sub> 500000 МЕ/г – 0,20, витамин В <sub>12</sub> 0,1 % – 1,00, витамин А ацетат 500000 МЕ/г – 0,80, пиридоксин гидрохлорид (В <sub>6</sub> ) 98 % – 0,70, рибофлавин (В <sub>2</sub> ) кормовой 80 % – 0,60, тиамин (В <sub>1</sub> ) микровит промикс 98 % – 0,60, фолиевая кислота 95 % – 0,20, менадион натрия бисульфат (К <sub>3</sub> ) 50 % – 0,08	0,10
Лавитол дегидрохверцетин 90 %	0,05
Холестерин 95 % Panreac	1,50

Таблица 2. Питательная ценность полнораціонного комбикорма

Table 2. All-in-one feed: nutritional value

Показатель	Содержание
Макронутриенты	
Сырой протеин, %	19,00
Сырой жир, %	5,00
Сырая клетчатка, %	4,00
Сырая зола, %	9,00
Крахмал, %	35,00
Сахар, %	5,50
Экстрактивные вещества, не содержащие азота, %	52,00
Минералы	
Кальций, %	1,80
Фосфор, %	1,10
Натрий, %	0,10
Магний, %	0,20
Калий, %	0,70
Аминокислоты	
Лизин, %	1,10
Метионин+цистин, %	0,70
Витамины	
Витамин А, ЕД	5 000
Витамин D <sub>3</sub> , ЕД	500
Витамин Е, мг	30,00
Тиамин В <sub>1</sub> , мг	2,24
Рибофлавин В <sub>2</sub> , мг	1,20
Никотиновая кислота В <sub>3</sub> , мг	6,00
Пантотеновая кислота В <sub>5</sub> , мг	22,15
Пиридоксин В <sub>6</sub> , мг	2,33
Биотин В <sub>7</sub> , мг	6,60
Фолиевая кислота В <sub>9</sub> , мг	10,00
Кобаламин В <sub>12</sub> , мкг	10,00
Витамин К <sub>3</sub> , мг	0,30
Микроэлементы	
Йод, мг	0,24
Железо, мг	18,00
Марганец, мг	9,00
Цинк, мг	22,5
Медь, мг	2,40
Селен, мг	0,06
Кобальт, мг	0,18

группы 4 – 2,52 ± 0,18 г «западной» диеты, мыши группы 5 потребляли 2,95 ± 0,19 г комбикорма.

До начала исследования и каждые 2 сут после начала эксперимента проводили взвешивание животных на лабораторных электронных весах (Ohaus, США). Общие клинические наблюдения проводили каждые 2 сут перед взвешиванием.

Эксперимент проводили в течение 24 суток. По окончании этого периода животных выводили из эксперимента путем усыпления в камере для эвтаназии (VetTech, Великобритания) с помощью углекислого газа, после чего проводили отбор крови и общую аутопсию.

Биохимические показатели плазмы крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе BioChem FC-360 («НТИ», США), используя наборы реактивов (HighTechnology, США), включая общий белок, альбумин, креатинин, мочевина, глюкоза, общий холестерин, холестерин липопротеинов высокой плотности, холестерин липопротеинов низкой плотности, триглицериды, активности аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы и щелочной фосфатазы.

Индекс атерогенности (ИА) плазмы крови определяли по формуле [21]:

$$IA = \frac{(OX - XC \text{ ЛПВП})}{XC \text{ ЛПВП}} \quad (1)$$

где OX – общий холестерин, ммоль/л; XC ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ммоль/л;

Остаточный холестерин (X<sub>ост</sub>, ммоль/л) определяли по формуле:

$$X_{\text{ост}} = OX - XC \text{ ЛПВП} - XC \text{ ЛПНП} \quad (2)$$

где ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности, ммоль/л.

Содержание лимфоцитов (LYM), гранулоцитов (GRA) и моноцитов (MON) определяли на проточном цитометре Guava Easy Cyte (Merck Millipore, Германия) посредством детектирования размера и гранулярности клеток. Содержание лейкоцитов определяли расчетным путем по формуле:

$$WBC = LYM + GRA + MON \quad (3)$$

где WBC – общее количество лейкоцитов; LYM – общее количество лимфоцитов; GRA – общее количество гранулоцитов; MON – общее количество моноцитов.

Относительное содержание лимфоцитов (LI, %), гранулоцитов (GRA, %) и моноцитов (MON, %) определяли расчетным путем по формулам:

$$LI = \frac{LYM}{WBC} \times 100 \quad (4)$$

$$GRA = \frac{GRA}{WBC} \times 100 \quad (5)$$

$$MON = \frac{MON}{WBC} \times 100 \quad (6)$$

Гистологические исследования и анализ полученных данных проводили в соответствии с протоколом [22].

Подготовка образцов включала отбор наружной левой доли печени (lobus ext. sin.), которую переносили на замораживающий столик (-20 °C). Срезы толщиной 10 мкм (с каждого образца печени по 2 среза) готовили на микротоме Microm HM-525 (Carl Zeiss, Германия), окрашивали Oil Red O (Sigma-Aldrich, США) без докраски ядер гематоксилином Эрлиха и заключали в монтирующую среду (Leika, Германия).

Изучение гистологических препаратов осуществляли на световом микроскопе AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия) с применением системы анализа изображений AxioVision 4.7.1.0. Анализировали не менее 5 полей зрения каждого среза при увеличении 20X. Количественную оценку проводили с использованием программы ImageJ (США).

Статистический анализ проводили с использованием программ STATISTICA 10 (США) и IBM SPSS Statistics 10 (США). Результаты представлены в виде медианы и стандартного отклонения ( $ME \pm SD$ ) и межквартильного размаха (P 25 – P 75). Статистическую достоверность рассчитывали с применением непараметрического критерия U Манна-Уитни. Вероятность 0,10 была выбрана в качестве значимого уровня.

### Результаты и их обсуждение

В последние годы возросла популярность продуктов питания с функциональными свойствами. Увеличение разнообразия таких продуктов является непростой задачей, а продвижение и разработка новых продуктов питания функциональной направленности могут улучшить здоровье человека [23]. Распространенность ожирения растет во всем мире и в настоящее время рассматривается как проблема здравоохранения [24].

Наблюдения за животными всех групп на протяжении всего эксперимента не выявили каких-либо отклонений в физиологическом состоянии: мыши были подвижны и активны; мышцы в тонусе; тактильная реакция сохранена; шерсть плотно прилегала к телу, гладкая, чистая, блестящая, кожный покров эластичный, без нарушения целостности; видимые слизистые оболочки бледно-розового цвета, истечений и признаков воспалительных реакций нет; глаза ярко-красного цвета; акты мочеиспускания и дефекации – соответствовали физиологической норме. В течение эксперимента сохранность контрольных животных была полной.

Динамика изменения массы тела животных в период исследования представлена на рисунке 1.

Динамика массы тела экспериментальных животных всех групп была положительной. Анализ динамики массы тела мышей выявил, что животные групп 1–4 набирали вес в течение всего периода, при этом наиболее выраженная тенденция в период с 1 по 12 сутки отмечена в группах 2, 3 и 4. Начиная с 16 суток и вплоть до 24 суток массы тела мышей групп 1, 3 и 4 достоверно превышали массу тела мышей группы 5 в среднем от 8,5 до 10 %. Суммарные привесы на 24 сутки относительно 1 суток эксперимента составили: для животных группы 1 – ( $22,5 \pm 8,3$ ) %, для группы 2 – ( $20,9 \pm 12,2$ ) %, для группы 3 – ( $24,9 \pm 6,8$ ) %, для группы 4 – ( $21,2 \pm 4,2$ ) %, для группы 5 – ( $15,4 \pm 6,1$ ) %.

Результаты анализа биохимических показателей сыворотки крови животных экспериментальных групп представлены в таблице 3.

Биохимические показатели плазмы крови мышей группы 5 соответствовали физиологической норме.

В плазме крови мышей групп 2–5 концентрация общего белка и альбумина статистически значимо не изменялась. В плазме крови животных группы 1 содержание общего белка было статистически значимо снижено на 4,8 % ( $p = 0,038$ ) по сравнению с группой 3, при этом концентрация альбумина снижалась на 7,4 % ( $p = 0,007$ ) относительно показателей группы 5.

В плазме крови мышей группы 4 отмечено снижение концентрации креатинина на 7,2 % ( $p = 0,065$ ) по сравнению с группой 5. Напротив, в плазме крови животных групп 3 и 1 содержание креатинина соответствовало значениям группы 5 и было снижено относительно группы 4 на 8,5 и 4,1 % ( $p = 0,050$ ) соответственно. В плазме крови мышей групп 4, 3, 2 и 1 относительно группы 5 выявлено снижение концентрации мочевины на 25,1 % ( $p < 0,001$ ), 29,0 % ( $p < 0,001$ ), 25,7 % ( $p < 0,001$ ) и 19,7 % ( $p = 0,005$ ) соответственно.

При определении уровней аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы статистически значимых изменений в активности аспартатаминотрансферазы в плазме крови мышей не выявлено. Это согласуется с данными, полученными G. Perdomo с соавторами [25]. У мышей группы 4 отмечена тенденция к снижению активности аланинаминотрансферазы на 15,5 % ( $p = 0,160$ ) относительно группы 5. Активность аланинаминотрансферазы в плазме крови животных групп 3 и 2 снижалась по сравнению с группой 5 на 28,4 % ( $p = 0,028$ ) и 29,8 % ( $p = 0,021$ ) соответственно.

Концентрация глюкозы в плазме крови мышей статистически значимо не изменялась между экспериментальными группами.

Отмечена тенденция к снижению содержания триглицеридов в плазме крови мышей групп 4, 3, 2 и 1 по сравнению с группой 5 на 23,0 % ( $p = 0,007$ ), 18,6 % ( $p = 0,234$ ), 13,3 % ( $p = 0,065$ ) и 13,3 % ( $p = 0,130$ ) соответственно. У групп 1 и 3 данная тенденция была

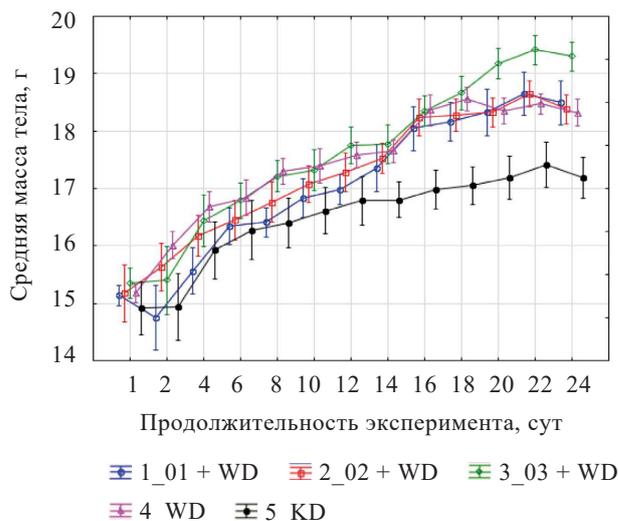


Рисунок 1. Динамика изменения массы тела животных

Figure 1. Changes in body weight

недостоверной ввиду значительного межквартильного размаха показателя внутри групп.

В плазме крови мышей групп 4, 3, 2 и 1 относительно группы 5 выявлено существенное увеличение концентрации общего холестерина на 65,1 % ( $p < 0,001$ ), 63,8 % ( $p = 0,002$ ), 61,1 % ( $p < 0,001$ ) и 66,4 % ( $p < 0,001$ ) соответственно. Содержание холестерина липопротеинов низкой плотности в плазме крови животных групп 4, 3, 2 и 1 превышало показатель группы 5 в 2,0 раза ( $p < 0,001$ ), 1,6 раз ( $p < 0,001$ ), 2,0 раза ( $p < 0,001$ ) и 1,9 раз ( $p < 0,001$ ) соответственно. Остаточный холестерин увеличивался в 3,1 раз ( $p < 0,001$ ) в группе 4; в 3,4 раза ( $p < 0,001$ ) в группе 3; в 3,2 раза ( $p < 0,001$ ) в группе 2 и в 3,3 раза ( $p < 0,001$ ) в группе 1. В плазме крови мышей группы 3 концентрация холестерина липопротеинов низкой плотности снижалась на 17,6 % ( $p = 0,005$ ) по сравнению с группой 4; в плазме крови животных групп 2 и 1 этот показатель был увеличен на 26,2 % ( $p = 0,003$ ) и 16,7 % ( $p = 0,021$ ) относительно группы 3. Содержание холестерина липопротеинов

высокой плотности в плазме крови животных групп 4, 3, 2 и 1 превышало показатель группы 5 на 25,4 % ( $p < 0,001$ ), 30,0 % ( $p = 0,015$ ), 27,3 % ( $p < 0,001$ ) и 28,2 % ( $p < 0,001$ ) соответственно. Повышение уровней общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности и холестерина липопротеинов низкой плотности в плазме крови связано с потреблением диеты с высоким содержанием жиров [26].

Увеличение концентрации общего холестерина в плазме крови мышей групп 4, 3, 2 и 1 синергично с ростом вклада атерогенных фракций липопротеинов способствовало значительному скачку в величине индекса атерогенности плазмы крови, который превышал показатель группы 5 у мышей группы 4 на 87,5 % ( $p < 0,001$ ), у мышей группы 3 на 75,0 % ( $p < 0,001$ ), у мышей группы 2 на 80,0 % ( $p < 0,001$ ) и у мышей группы 1 на 85,0 % ( $p < 0,001$ ).

Выявленные у животных, потреблявших «западную» диету, изменения липидного профиля сыворотки крови наблюдались у мышей, которым параллельно

Таблица 3. Результаты биохимического анализа плазмы крови мышей

Table 3. Biochemical analysis of blood plasma

Показатели	Характеристики выборки	Группы				
		1	2	3	4	5
Белок, г/л	ME ± SD	<b>47,10 ± 0,92<sup>^</sup></b>	47,00 ± 2,77	49,50 ± 2,52	47,30 ± 3,43	47,25 ± 3,32
	P 25–P 75	45,95–47,45	45,05–49,35	47,15–50,30	45,20–50,25	45,45–50,50
Альбумин, г/л	ME ± SD	<b>25,00 ± 0,76*</b>	26,00 ± 1,46	25,75 ± 1,31	26,00 ± 1,13	27,00 ± 1,07
	P 25–P 75	25,00–26,00	24,50–27,00	25,00–27,50	25,00–27,00	26,00–27,50
Креатинин, мкмоль/л	ME ± SD	<b>47,02 ± 3,51<sup>#</sup></b>	48,85 ± 3,86	<b>49,00 ± 2,77<sup>#</sup></b>	45,15 ± 2,17	48,65 ± 3,52
	P 25–P 75	46,40–52,70	44,75–50,30	46,25–50,65	44,70–46,75	45,65–52,45
Мочевина, ммоль/л	ME ± SD	<b>6,49 ± 1,06*</b>	<b>6,00 ± 0,45*</b>	<b>5,74 ± 0,29*</b>	<b>6,05 ± 0,52*</b>	8,08 ± 1,64
	P 25–P 75	5,67–6,71	5,61–6,20	5,70–6,05	5,78–6,55	7,71–8,69
АЛТ, ЕД/л	ME ± SD	45,25 ± 22,49	<b>45,20 ± 11,87<sup>#</sup></b>	<b>46,10 ± 10,40*</b>	54,40 ± 10,84	64,40 ± 6,66
	P 25–P 75	39,20–65,25	40,05–50,30	40,80–61,20	49,65–70,10	59,05–71,05
АСТ, ЕД/л	ME ± SD	105,80 ± 23,59	100,75 ± 19,38	115,05 ± 20,46	98,15 ± 25,98	104,15 ± 35,79
	P 25–P 75	93,20–129,45	93,15–116,30	95,65–129,95	93,50–107,45	95,10–119,50
Глюкоза, ммоль/л	ME ± SD	12,05 ± 1,21	11,30 ± 1,11	11,85 ± 1,85	11,10 ± 1,09	10,55 ± 1,72
	P 25–P 75	11,00–12,80	10,70–12,50	11,40–12,10	10,65–12,25	9,60–12,55
Триглицериды, ммоль/л	ME ± SD	0,98 ± 0,17	0,98 ± 0,11	0,92 ± 0,23	<b>0,87 ± 0,10*</b>	1,13 ± 0,18
	P 25–P 75	0,80–1,14	0,88–1,07	0,80–1,15	0,81–1,00	1,09–1,26
ОХ, ммоль/л	ME ± SD	<b>2,48 ± 0,15*</b>	<b>2,40 ± 0,18*</b>	<b>2,44 ± 0,44*</b>	<b>2,46 ± 0,17*</b>	1,49 ± 0,10
	P 25–P 75	2,33–2,57	2,27–2,61	1,99–2,60	2,31–2,51	1,43–1,57
ХС ЛПНП, ммоль/л	ME ± SD	<b>0,49 ± 0,05*<sup>^</sup></b>	<b>0,53 ± 0,05*<sup>&amp;</sup></b>	<b>0,42 ± 0,05*<sup>#</sup></b>	<b>0,51 ± 0,05*</b>	0,26 ± 0,02
	P 25–P 75	0,46–0,54	0,48–0,56	0,39–0,45	0,51–0,55	0,25–0,27
ХС ЛПВП, ммоль/л	ME ± SD	<b>1,41 ± 0,11*</b>	<b>1,40 ± 0,10*</b>	<b>1,43 ± 0,29*</b>	<b>1,38 ± 0,12*</b>	1,10 ± 0,08
	P 25–P 75	1,31–1,51	1,35–1,48	1,26–1,52	1,24–1,45	1,01–1,16
X <sub>Сост</sub> , ммоль/л	ME ± SD	<b>0,53 ± 0,04*</b>	<b>0,51 ± 0,10*</b>	<b>0,55 ± 0,21*</b>	<b>0,50 ± 0,12*</b>	0,16 ± 0,07
	P 25–P 75	0,52–0,58	0,41–0,60	0,35–0,69	0,44–0,56	0,10–0,21
ИА, отн. ед.	ME ± SD	<b>0,74 ± 0,04*</b>	<b>0,72 ± 0,07*</b>	<b>0,70 ± 0,22*</b>	<b>0,75 ± 0,11*</b>	0,40 ± 0,07
	P 25–P 75	0,71–0,78	0,68–0,78	0,64–0,81	0,72–0,79	0,33–0,43

Примечание: \* – достоверное отличие от группы 5 ( $p < 0,05$ ); # – достоверное отличие от группы 4 ( $p < 0,05$ ); ^ – достоверное отличие между группами 1 и 3 ( $p < 0,05$ ); & – достоверное отличие между группами 2 и 3 ( $p < 0,05$ ).

Note: \* – significant difference from Group 5 ( $p < 0.05$ ); # – significant difference from Group 4 ( $p < 0.05$ ); ^ – significant difference between Groups 1 and 3 ( $p < 0.05$ ); & – significant difference between Groups 2 and 3 ( $p < 0.05$ ).

с жирной диетой скармливали кисломолочный продукт на основе кобыльего молока и смеси кобыльего и коровьего молока. Потребление на фоне «западной» диеты кисломолочного продукта на основе кобыльего молока и смеси кобыльего и коровьего молока приводило к снижению холестерина липопротеинов низкой плотности при увеличении содержания холестерина липопротеинов высокой плотности. В плазме крови мышей, потреблявших «западную» диету и кисломолочные продукты на основе кобыльего молока и смеси кобыльего и коровьего молока, зафиксировано снижение метаболических показателей (креатинин и мочевины) и активности аланинаминотрансферазы, отмеченных у контрольных животных, что указывает на гепатопротекторный эффект кисломолочных продуктов.

Результаты анализа цитометрических показателей крови животных экспериментальных групп представлены в таблице 4.

Цитометрические показатели крови мышей группы 5 соответствовали физиологической норме. В крови мышей группы 4 по сравнению с показателями мышей группы 5 отмечена тенденция к увеличению количества лейкоцитов на 16,3 % ( $p = 0,227$ ), гранулоцитов на 66,3 % ( $p = 0,021$ ), лимфоцитов на 15,7 % ( $p = 0,318$ ) соответственно. В отношении содержания моноцитов, которое в среднем увеличивалось, наблюдался значительный межквартильный размах. Отмеченные изменения не повлекли за собой значимых изменений относительных содержаний популяций лейкоцитов, выявлено статистически незначимое увеличение относительного содержания гранулоцитов на 16,1 % ( $p = 0,227$ ). Статистически значимых различий между

показателями животных группы 3 и группы 5 выявлено не было, однако отмечена тенденция к снижению количества лейкоцитов на 11,4 % ( $p = 0,958$ ), преимущественно за счет снижения лимфоцитов на 12,6 % ( $p = 0,958$ ). Достоверных изменений в относительном содержании популяций лейкоцитов не выявлено.

Статистически значимых различий между показателями животных группы 2 и группы 5 выявлено не было, однако выявлена тенденция к росту количества лейкоцитов, отмеченная при анализе показателей крови животных группы 4. Содержание количества лейкоцитов увеличивалось на 17,6 % ( $p = 0,382$ ) по сравнению с группой 5, рост содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов составил 15,1 % ( $p = 0,442$ ), 21,6 % ( $p = 0,328$ ) и 50,5 % ( $p = 0,105$ ) соответственно. Значимых изменений относительных содержаний популяций лейкоцитов показано не было, за исключением тенденции к увеличению доли гранулоцитов на 28,7 % ( $p = 0,505$ ) по сравнению с показателями группы 5. Статистически значимых различий между группой 2 и группой 1 отмечено не было.

При сравнении с группой 3 в крови мышей группы 2 выявлена тенденция к росту количества лейкоцитов на 32,7 % ( $p = 0,195$ ) при увеличении числа лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов – на 31,8 % ( $p = 0,234$ ), 29,2 % ( $p = 0,234$ ) и 27,7 % ( $p = 0,130$ ) соответственно. Отмеченные наблюдения не повлекли за собой значимых изменений относительных содержаний популяций лейкоцитов, однако отмечена тенденция к увеличению доли гранулоцитов на 17,1 % ( $p = 0,442$ ).

В крови мышей группы 1 отмечена тенденция к росту количества лейкоцитов (на 35,8 % ( $p = 0,195$ )) по

Таблица 4. Результаты цитометрического анализа крови экспериментальных животных

Table 4. Cytometric blood tests

Показатели	Характеристики выборки	Группы				
		1	2	3	4	5
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	ME ± SD	<b>15,02 ± 2,76<sup>^</sup></b>	13,01 ± 2,81	9,80 ± 2,50	12,86 ± 5,89	11,06 ± 4,81
	P 25–P75	12,24–15,90	10,95–15,03	8,81–12,76	10,96–16,82	5,98–14,69
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	ME ± SD	<b>12,32 ± 2,21<sup>^</sup></b>	10,87 ± 2,30	8,25 ± 2,36	10,92 ± 4,61	9,44 ± 4,23
	P 25–P75	10,17–13,22	9,17–12,19	7,32–10,91	8,71–14,30	5,00–12,29
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	ME ± SD	0,73 ± 0,16	0,62 ± 0,21	0,48 ± 0,15	0,59 ± 0,47	0,51 ± 0,26
	P 25–P75	0,55–0,80	0,46–0,84	0,42–0,66	0,47–0,79	0,31–0,77
Гранулоциты, 10 <sup>9</sup> /л	ME ± SD	<b>1,78 ± 0,45<sup>*^</sup></b>	1,52 ± 0,41	<b>1,19 ± 0,22<sup>#</sup></b>	<b>1,68 ± 0,46<sup>*</sup></b>	1,01 ± 0,49
	P 25–P75	1,53–2,04	1,13–1,91	1,06–1,34	1,31–2,05	0,68–1,35
Лимфоциты, %	ME ± SD	82,99 ± 1,80	82,55 ± 2,03	84,11 ± 3,52	83,66 ± 5,22	85,38 ± 3,59
	P 25–P75	82,17–84,00	81,65–84,84	82,23–86,09	79,23–85,21	80,51–87,04
Моноциты, %	ME ± SD	4,54 ± 0,46	4,73 ± 0,63	5,11 ± 0,47	4,72 ± 0,91	4,81 ± 0,74
	P 25–P75	4,42–5,04	4,47–5,41	4,89–5,15	3,99–4,86	4,51–5,62
Гранулоциты, %	ME ± SD	12,53 ± 1,62	12,81 ± 1,93	10,94 ± 3,65	11,55 ± 4,83	9,95 ± 3,14
	P 25–P75	11,21–12,99	10,17–13,69	8,70–13,30	10,30–15,48	8,32–13,92

Примечание: \* – достоверное отличие от группы 5 ( $p < 0,05$ ); # – достоверное отличие от группы 4 ( $p < 0,05$ ); ^ – достоверное отличие между группами 1 и 3 ( $p < 0,05$ ); & – достоверное отличие между группами 2 и 3 ( $p < 0,05$ ).

Note: \* – significant difference from Group 5 ( $p < 0.05$ ); # – significant difference from Group 4 ( $p < 0.05$ ); ^ – significant difference between Groups 1 and 3 ( $p < 0.05$ ); & – significant difference between Groups 2 and 3 ( $p < 0.05$ ).

сравнению с группой 5), количество гранулоцитов возросло на 76,2 % ( $p = 0,0207$ ), содержание лимфоцитов и моноцитов увеличивалось на 30,5 % ( $p = 0,279$ ) и 43,1 % ( $p = 0,382$ ) соответственно. Отмечена тенденция к увеличению доли гранулоцитов на 25,9 % ( $p = 0,574$ ). Относительно показателей группы 4 в крови животных группы 1 количество лейкоцитов увеличивалось на 16,8 % ( $p = 0,878$ ), преимущественно за счет увеличения числа лимфоцитов на 12,8 % ( $p = 0,878$ ).

При сравнении цитометрических показателей животных группы 1 с показателями группы 3 выявлено статистически значимое увеличение количества лейкоцитов на 53,3 % ( $p = 0,037$ ) за счет увеличения числа лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов на 49,3 % ( $p = 0,049$ ), 52,1 % ( $p = 0,105$ ) и 49,6 % ( $p = 0,021$ ) соответственно. Отмечена тенденция к увеличению доли гранулоцитов на 14,5 % ( $p = 0,328$ ).

На фоне «западной» диеты кисломолочный продукт на основе кобыльего и коровьего молока вызвал статистически значимое снижение количества гранулоцитов (на 27,4 % при  $p = 0,024$  относительно группы 4), тогда как статистически значимых изменений в распределении лейкоцитов мышей, потреблявших продукты сравнения, отмечено не было. Увеличение гранулоцитов в крови мышей группы 4 (на 66,3 %, при  $p = 0,021$  относительно интакта) может быть опосредовано потреблением значительного количества насыщенных жиров. Этот вывод согласуется с работами, в которых продемонстрирована инициация воспаления жировой ткани и истощение микробиоты мышей, которых кормили жирной диетой [27, 28]. Снижение гранулоцитов в крови мышей, потреблявших на фоне «западной» диеты продукт на основе кобыльего и коровьего молока, свидетельствует о нивелировании воспаления за счет позитивного действия на микробиом за счет регулирования врожденной иммунной системы. Данный вывод может быть основан на том, что изменения в микробиоте кишечника приводят к изменениям в экспрессии цитокинов, что приводит к противовоспалительной модуляции иммунной системы мышей [29].

Результаты гистологического исследования печени представлены на рисунке 2.

Ткани печени мышей групп 2–4 при окрашивании масляным красным характеризовались значительным количеством жировых включений крупных размеров (особенно мышей групп 3 и 4), локализующихся в зонах печеночных долек и расположенных ближе к центральной вене. Нейтральные липиды выявлялись внутри цитоплазматических вакуолей, нарушающих архитектуру гепатоцитов, смещая их ядра на периферию клеток и сдавливая синусоидальные пространства.

Плотность окрашивания печени масляным красным у мышей группы 1 составила ( $14,45 \pm 6,3$ ), группы 2 – ( $45,3 \pm 3,3$ ), группы 3 – ( $45,6 \pm 3,0$ ) и группы 4 – ( $44,1 \pm 3,6$ ). Для тканей печени мышей группы 5 данный показатель составлял ( $10,4 \pm 4,5$ ). Показатель

плотности окрашивания печени мышей групп 1–4 относительно группы 5 увеличивался на 46,4 % для мышей группы 1, до 4,7 раз – для групп 2 и 3, в 4,6 раз – для группы 4. У мышей группы 1 плотность окрашивания печени снижалась относительно групп 2, 3 и 4 более чем в 3 раза (рис. 2f). Гистологические исследования печени продемонстрировали заметное снижение накопления нейтральных липидов в цитоплазматических вакуолях гепатоцитов (площадь окрашивания в 3 раза меньше по сравнению с продуктами сравнения). Снижение накопления жира в печени может быть обусловлено эффектами лактобацилл, входящих в состав закваски [30].

### Выводы

Проведенный комплекс исследований по доклиническому изучению разработанного кисломолочного продукта свидетельствует о наличии у него биологических эффектов, что подтверждается функциональными свойствами. При введении в рацион экспериментальных животных разработанного продукта совместно с «западной» диетой выявлено снижение гранулоцитов, что свидетельствует о нивелировании воспаления за счет позитивного действия на микробиом и регулирования врожденной иммунной системы. Употреблении на фоне «западной» диеты кисломолочного продукта на основе кобыльего и коровьего молока приводило к снижению холестерина липопротеинов низкой плотности при увеличении содержания холестерина липопротеинов высокой плотности. В плазме крови мышей, потреблявших «западную» диету и кисломолочные продукты на основе кобыльего молока и смеси кобыльего и коровьего молока, выровнилось снижение метаболических показателей (креатинин и мочевины) и активности аланинаминотрансферазы, зафиксированных у контрольных животных, что указывает на гепатопротекторный эффект кисломолочных продуктов.

Величина индекса атерогенности плазмы крови мышей группы 3, потреблявших «западную» диету и кисломолочный продукт на основе кобыльего и коровьего молока, превышала показатель группы 5 на 75,0 % ( $p < 0,001$ ), тогда как у мышей группы 4 превышал интакта на 87,5 % ( $p < 0,001$ ), у мышей группы 2 – на 80,0 % ( $p < 0,001$ ) и у мышей группы 1 – на 85,0 % ( $p < 0,001$ ). Гистологические исследования печени показали заметное снижение накопления нейтральных липидов в цитоплазматических вакуолях гепатоцитов (площадь окрашивания в 3 раза меньше по сравнению с продуктами сравнения), что может быть обусловлено микроорганизмами, входящими в состав закваски, в частности *Lactobacillus bulgaricus*. На фоне «западной» диеты кисломолочный продукт на основе кобыльего молока и коровьего молока приводил к снижению относительной массы печени мышей группы 3 на 23,3 % ( $p = 0,007$ ) относительно группы 2 и на 15,5 % ( $p = 0,002$ ) относительно группы 1, что подтверждает гепатопротекторный эффект кисломолочного продукта. У мышей

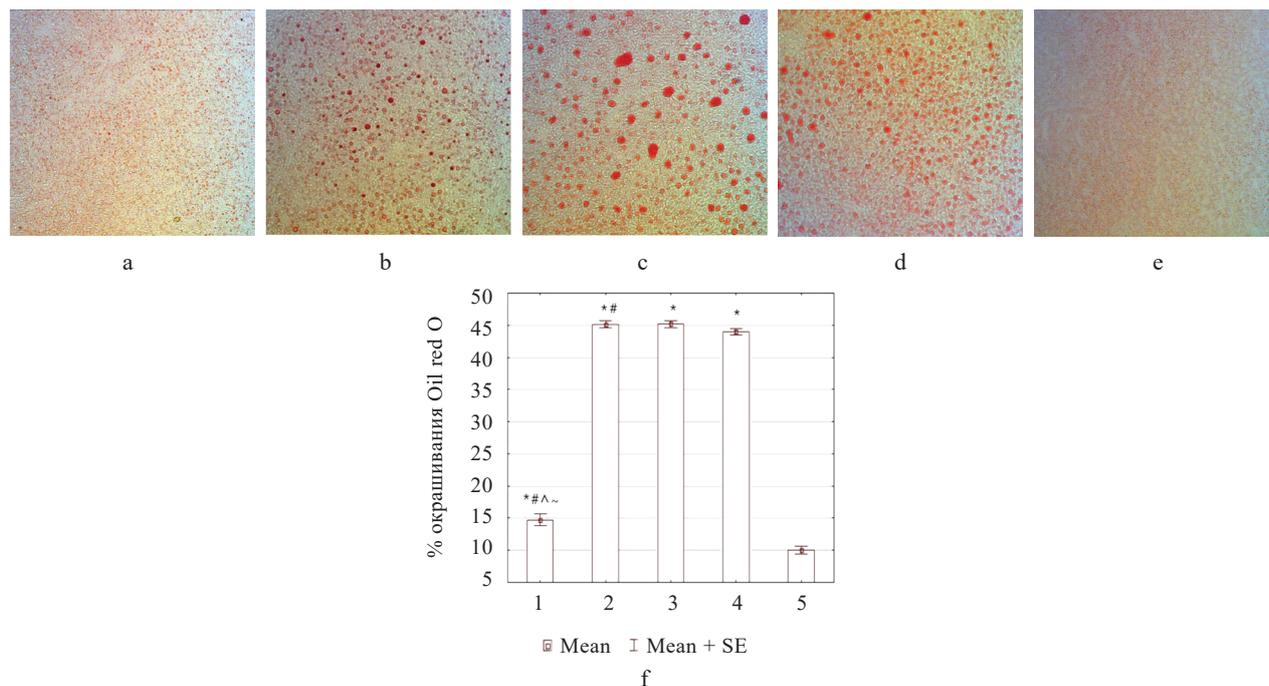


Рисунок 2. Гистологическая картина печени мышей, окраска: масляный красный, увеличение 20×. Условные обозначения: а – группа 1; b – группа 2; с – группа 3; d – группа 4; e – группа 5; f – гистограмма площадей окрашивания тканей печени масляным красным

Figure 2. Histology of liver tissues stained with oil red, magnification 20×: a – Group 1; b – Group 2; c – Group 3; d – Group 4; e – Group 5; f – histogram of stained liver tissues

группы 1, в рацион которых на фоне «западной» диеты вводили продукт из кобыльего молока, отмечено увеличение относительной массы тимуса и селезенки, что указывает на возможное стимулирование гемопоэза и накопление в селезенке нейтрофилов. Выявленное снижение плотности окрашивания печени (относительно групп 2, 3 и 4 более чем в 3 раза) свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования кобыльего молока в качестве сырья.

Полученные результаты подтверждают целесообразность дальнейших исследований разработанного кисломолочного продукта для определения возможности его включения в комплексную диету для профилактики неалкогольной жировой болезни печени.

#### Критерии авторства

Е. С. Симоненко – сбор и обобщение материалов, написание введения; С. В. Симоненко – руководил проектом, написание заключения; А. В. Бегунова – обобщение материала, написание раздела статьи по

результатам исследования; А. Н. Петров – доработка рукописи; Е. С. Семенова – написание раздела статьи по методам исследования.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Contribution

E.S. Simonenko collected and described the materials, as well as wrote the introduction; S.V. Simonenko supervised the project and formulated the conclusion; A.V. Begunova described the materials and research results; A.N. Petrov proofread the manuscript; E.S. Semenova described the research methods.

#### Conflict of interest

The authors reported no conflict of interests regarding the publication of this article.

#### References/Список литературы

1. Plamada D, Teleky B-E, Nemes SA, Mitrea L, Szabo K, Călinoiu L-F, et al. Plant-based dairy alternatives - A future direction to the milky way. *Foods*. 2023;12(9):1883. <https://doi.org/10.3390/foods12091883>
2. Zobkova ZS. Dependence of the relative biological value of fermented milk drinks on the type of starter microorganisms. *Dairy Industry*. 2020;(8):36–37. (In Russ.). <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-08-36-37>; <https://elibrary.ru/XZVCXA>

3. Byberg L, Lemming E W. Milk Consumption for the Prevention of Fragility Fractures. *Nutrients*. 2020;12(9):2720. <https://doi.org/10.3390/nu12092720>.
4. Nestel PJ, Mellett N, Pally S, Wong G, Barlow CK, Croft K, *et al.* Effects of low-fat or full-fat fermented and non-fermented dairy foods on selected cardiovascular biomarkers in overweight adults. *British Journal of Nutrition*. 2013;110(12):2242–2249. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001621>
5. Sonestedt E, Wirfält E, Wallström P, Gullberg B, Orho-Melander M, Hedblad B. Dairy products and its association with incidence of cardiovascular disease: the Malmö diet and cancer cohort. *European Journal of Epidemiology*. 2011;26:609–618. <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9589-y>
6. Park YW. Goat Milk – Chemistry and Nutrition. In: Haenlein GF, Wendorff WL, Park YW, editors. *Handbook of milk of non-bovine mammals*. London: Blackwell; 2006; pp. 34–58. <https://doi.org/10.1002/9781119110316>
7. Czyżak-Runowska G, Wójtowski JA, Danków R, Stanisławski D. Mare’s milk from a small polish specialized farm - Basic chemical composition, fatty acid profile, and healthy lipid indices. *Animals*. 2021;11(6):1590. <https://doi.org/10.3390/ani11061590>
8. Faccia M, D’Alessandro AG, Summer A, Hailu Y. Milk products from minor dairy species: A review. *Animals*. 2020;10(8):1260. <https://doi.org/10.3390/ani10081260>
9. Baibokonov D, Yang Y, Tang Y, Hosain MdS. Understanding the traditional mares’ milk industry’s transformation into a creative industry: Empirical evidence from Kazakhstan. *Growth and Change*. 2021;52(2):1172–1196. <https://doi.org/10.1111/grow.12478>
10. Sarsembayev KhS, Sinyavskiy YuA, Deripaskina EA, Tuigunov DN, Torgautov AS. Fermented dairy product for sports nutrition. *Human. Sport. Medicine*. 2022;22(1):148–154. (In Russ.). <https://doi.org/10.14529/hsm220120>; <https://elibrary.ru/ITTKAB>
11. Simonenko ES, Simonenko SV, Zolotin AYU, Bessarab OV. Development of a methodology for assessing the organoleptic perception of a food product. *Food Industry*. 2021;(6):57–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.52653/PPI.2021.6.6.006>; <https://elibrary.ru/LCVZBC>
12. Semenova ES, Simonenko ES, Manuilov BM, Kopytko MS. Mare’s milk is a promising raw material for creating baby food products with functional properties. *Food Industry*. 2022;(11):58–61. (In Russ.). <https://doi.org/10.52653/PPI.2022.11.11.014>; <https://elibrary.ru/LDKRLO>
13. Singh S, Sharma RK, Malhotra S, Pothuraju R, Shandilya UK. *Lactobacillus rhamnosus* NCDC17 ameliorates type-2 diabetes by improving gut function, oxidative stress and inflammation in high-fat-diet fed and streptozotocintreated rats. *Beneficial Microbes*. 2016;8(2):243–55. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0090>
14. Navrátilová P, Pospíšil J, Borkovcová I, Kaniová L, Dluhošová S, Horáková S. Content of nutritionally important components in mare milk fat. *Mljekarstvo*. 2018;68(4):282–294. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2018.0404>
15. Francque SM, Van Der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: pathophysiological mechanisms and implications. *Journal of Hepatology*. 2016;65(2):425–443. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.005>
16. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, *et al.* Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(33):12511–12516. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601056103>
17. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: a meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 2016;65(3):589–600. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.013>
18. Zhang, QQ, Lu L-G. Nonalcoholic fatty liver disease: dyslipidemia, risk for cardiovascular complications, and treatment strategy. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2015;3(1):74–78. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00037>
19. Katsiki N, Mikhailidis DP, Mantzoros CS. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: an update. *Metabolism*. 2016;65(8):1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.05.003>
20. Fedulova LV. Theoretical validity and practical effectiveness of an integrated approach to the research of specialized food products. Dr. Tech. Sci. dis. Moscow: Federal Research Center for Food Systems named after. V.M. Gorbatoва; 2021. 361 p. (In Russ.). [Федулова Л. В. Теоретическая обоснованность и практическая эффективность комплексного подхода к исследованиям специализированных пищевых продуктов: дис. ... д-ра техн. наук: 06.01.21. М., 2021. 361 с.]. <https://elibrary.ru/FIDJOS>
21. Chernukha I, Kotenkova E, Derbeneva S, Khvostov D. Bioactive compounds of porcine hearts and aortas may improve cardiovascular disorders in humans. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(14):7330. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147330>
22. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature Protocols*. 2013;8(6):1149–1154. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.055>
23. Abdel-Salam AM. Functional foods: Hopefulness to good health. *American Journal of Food Technology*. 2010;5(2):86–99. <https://doi.org/10.3923/ajft.2010.86.99>
24. Lazo, M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. In *Seminars in liver disease*. 2008;28(04):339–350. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1091978>

25. Perdomo G, Kim DH, Zhang T, Qu S, Thomas EA, Toledo FGS, et al. A role of apolipoprotein D in triglyceride metabolism [S]. *Journal of lipid research*. 2010;51(6):1298–1311. <https://doi.org/10.1194/jlr.M001206>
26. Ali K, Abo-Ali EM, Kabir MD, Riggins B, Nguy S, Li L, et al. A Western-fed diet increases plasma HDL and LDL-cholesterol levels in ApoD<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One*. 2014;9(12):e115744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115744>
27. Rogero MM, Calder PC. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*. 2018;10(4):432. <https://doi.org/10.3390/nu10040432>
28. Zhang D, Frenette PS. Cross talk between neutrophils and the microbiota. *Blood*. 2019;133(20):2168–2177. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844555>
29. Aktas B, De Wolfe TJ, Tandee K, Safdar N, Darien BJ, Steele JL. The Effect of *Lactobacillus casei* 32G on the Mouse Cecum Microbiota and Innate Immune Response Is Dose and Time Dependent. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0145784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145784>
30. Ma J, Zhou Q, Li H. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy. *Nutrients*. 2019;9(10):1124. <https://doi.org/10.3390/nu9101124>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2536>  
<https://elibrary.ru/LVZREP>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Идентификация и предиктивный анализ аминокислотных паттернов, обуславливающих потенциальную антигиперурикемическую активность пептидов



А. В. Смирнова<sup>1,2</sup>, С. Л. Тихонов<sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Уральский государственный экономический университет<sup>ROR</sup>, Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> Фонд поддержки проектов Национальной технологической инициативы, Москва, Россия

<sup>3</sup> Уральский государственный аграрный университет<sup>ROR</sup>, Екатеринбург, Россия

<sup>4</sup> Уральский государственный лесотехнический университет<sup>ROR</sup>, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию: 15.01.2024

Принята после рецензирования: 26.02.2024

Принята к публикации: 05.03.2024

\*С. Л. Тихонов: [tihonov75@bk.ru](mailto:tihonov75@bk.ru),

<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

А. В. Смирнова: <https://orcid.org/0000-0003-1668-1149>

© А. В. Смирнова, С. Л. Тихонов, 2024



### Аннотация.

Пептиды являются потенциально перспективными аналогами синтетических лекарственных препаратов для лечения гиперурикемии. Цель исследования – идентифицировать устойчивые аминокислотные паттерны, обуславливающие ингибирующую ксантиноксидазную активность пептидов, предложить на их основе новые антигиперурикемические пептиды с доказанной посредством использования методологии предиктивной аналитики *in silico* эффективностью. Объектами исследования являлись пептиды, обладающие ингибирующей ксантиноксидазной активностью. В работе применялась авторская программа поиска, идентификации и количественной оценки повторяющихся сочетаний аминокислотных остатков в целевых пептидных последовательностях. Проводили оценку физико-химических и фармакокинетических свойств, ингибирующей ксантиноксидазной активности, общей и целевой биологической активности, а также токсичности идентифицированных пептидов. Количество аминокислот в цепи, изоэлектрическая точка, заряд при нейтральном pH, молекулярная масса пептидов и индекс гидрофобности были рассчитаны теоретически.

Идентифицированы аминокислотные паттерны, ответственные за процесс ингибирования фермента ксантиноксидазы, сгенерированы новые пептидные последовательности. Идентифицированы 49 нетоксичных пептидов с различной длиной аминокислотной последовательности, обладающих потенциально высокой антимикробной и ингибирующей активностью в отношении целевых мишеней лекарственных препаратов, используемых при гиперурикемии и сахарном диабете 2 типа. Пептиды охарактеризовали как низкомолекулярные соединения гидрофильной (преимущественно) и гидрофобной природы длиной от 4 до 7 аминокислот, содержащие в структуре преимущественно аминокислотные остатки пролина, триптофана и фенилаланина со средней молекулярной массой 723 Да и отрицательным зарядом.

Результаты данного исследования являются важным шагом в понимании молекулярных механизмов ингибирования фермента ксантиноксидазы и открывают новые перспективы для разработки антигиперурикемических пептидных препаратов.

**Ключевые слова.** Пептиды, гиперурикемия, ингибиторы ксантиноксидазы, аминокислотные паттерны, IC<sub>50</sub>

**Для цитирования:** Смирнова А. В., Тихонов С. Л. Идентификация и предиктивный анализ аминокислотных паттернов, обуславливающих потенциальную антигиперурикемическую активность пептидов // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 687–700. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2536>

## Amino Acid Patterns that Determine Antihyperuricemic Activity of Peptides: Identification and Predictive Analysis



Anastasia V. Smirnova<sup>1,2</sup>, Sergey L. Tikhonov<sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Ural State University of Economics<sup>ROR</sup>, Yekaterinburg, Russia

<sup>2</sup> National Technology Initiative Project Support Fund, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Ural State Agrarian University<sup>ROR</sup>, Yekaterinburg, Russia

<sup>4</sup> Ural State Forest Engineering University<sup>ROR</sup>, Yekaterinburg, Russia

Received: 15.01.2024

Revised: 26.02.2024

Accepted: 05.03.2024

\*Sergey L. Tikhonov: [tikhonov75@bk.ru](mailto:tikhonov75@bk.ru),

<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Anastasia V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0003-1668-1149>

© A.V. Smirnova, S.L. Tikhonov, 2024



### Abstract.

Peptides offer a promising analogue to synthetic drugs in treating hyperuricemia. This article introduces reliable amino acid patterns that cause the inhibitory xanthine oxidase (XO) activity of peptides. The research objective was to propose new antihyperuricemic peptides and prove their effectiveness by predictive analytics *in silico*.

The study featured peptides with inhibitory xanthine oxidase activity. The authors developed a protocol for searching, identifying, and quantifying patterns of amino acid residues in target peptide sequences. The identified peptides were tested for physicochemical properties, pharmacokinetic profile, inhibitory xanthine oxidase activity, general and target biological activity, and toxicity.

The research revealed amino acid patterns responsible for inhibiting the xanthine oxidase enzyme, as well as generated new peptide sequences. Forty-nine non-toxic peptides with different lengths of amino acid sequences demonstrated high antimicrobial and inhibitory potential against the targeted drugs used to treat hyperuricemia and type 2 diabetes mellitus. The peptides were low-molecular compounds of predominantly hydrophilic and hydrophobic nature, 4–7 amino acids long. They contained negatively charged amino acid residues of proline, tryptophan, and phenylalanine with an average molecular weight of 723 Da. The study offers an important insight into the molecular mechanisms of xanthine oxidase inhibition and opens up new prospects for developing novel antihyperuricemic peptide drugs.

**Keywords.** Peptides, hyperuricemia, xanthine oxidase inhibitors, amino acid patterns,  $IC_{50}$

**For citation:** Smirnova AV, Tikhonov SL. Amino Acid Patterns that Determine Antihyperuricemic Activity of Peptides: Identification and Predictive Analysis. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):687–700. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2536>

### Введение

Гиперурикемия является одним из самых распространенных метаболических нарушений текущего времени (нарушений обмена пуриновых оснований) и оказывает значительное влияние на качество жизни современного человека. Согласно статистическим данным, в Российской Федерации распространенность гиперурикемии достигает 16,8 %, в том числе 25,3 % – среди мужчин и 11,3 % – среди женщин [1]. Риск развития гиперурикемии увеличивается у мужчин после 30 лет, а у женщин – после 50. Возраст является одним из факторов риска для развития гиперурикемии, однако заболевание может возникнуть и у молодых людей, включая детей и подростков [2].

Гиперурикемию можно охарактеризовать как метаболическое состояние, при котором избыточно вырабатывается мочевая кислота или происходит дисфункциональная экскреция в сыворотку крови. Избыточная

выработка мочевой кислоты может происходить из-за повышенного образования пуриновых оснований или из-за нарушений в процессе их метаболизма. Некоторые продукты питания содержат большое количество пуриновых оснований, что может привести к увеличению образования мочевой кислоты в плазме крови вследствие их избыточного потребления. Другая причина гиперурикемии – дисфункциональная экскреция мочевой кислоты в кровь. Почки отделяют и выводят ее из плазмы естественным путем (через физиологические жидкости), но при некоторых заболеваниях или нарушениях функции почек экскреция мочевой кислоты может быть нарушена, что приводит к ее накоплению в крови [3]. Концентрацию мочевой кислоты в сыворотке крови можно регулировать, либо ингибировать ее синтез, либо облегчая ее выведение [4].

Гиперурикемия может быть связана с различными атипичными физиологическими состояниями и забо-

леваниями, такими как подагра, хроническая почечная недостаточность, метаболический синдром, атеросклероз, инсулинорезистентность и др. [3].

В терапевтические стратегии лечения подагры включено снижение уровня мочевой кислоты и предотвращение ассоциированных с гиперурикемией осложнений, т. е. изменение рациона питания, употребление большего количества жидкости, а также применение лекарственных препаратов, которые уменьшают образование мочевой кислоты или способствуют ее выведению из организма. Ингибирование синтеза мочевой кислоты может быть достигнуто с помощью лекарственных препаратов, которые замедляют процесс ее образования. Некоторые из таких препаратов воздействуют на ферменты, участвующие в синтезе мочевой кислоты, ингибируют их активность и тем самым снижают уровень ее содержания в плазме. Существуют лекарственные препараты-урикозурики, повышающие экскрецию мочевой кислоты почками и тем самым снижающие ее уровень в плазме. В настоящее время 3 категории лекарственных препаратов применяются при лечении гиперурикемии: 1) лекарственные препараты-ингибиторы ксантиноксидазы (аллопуринол, фебуксостат и топилоксостат); 2) лекарственные препараты, способствующие выведению уратов (пробенецид, RDEA594); 3) лекарственные препараты-катализаторы превращения мочевой кислоты в аллантаин (пеглотиказа) [5–8]. Ингибирование активности ферментной системы ксантиноксидазы было признано основной стратегией снижения уровня мочевой кислоты и окислительного стресса при гиперурикемии [6]. Недавние исследования показали, что ингибиторы ксантиноксидазы играют существенную роль в лечении гиперурикемии, т. к. ксантиноксидаза катализирует превращение гипоксантина в ксантин, а затем превращает её в мочевую кислоту с одновременным синтезом супероксиданионов ( $O_2^-$ ), перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и активных форм кислорода в каталитическом процессе [9]. Ксантиноксидаза считается эффективной мишенью для снижения концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови. Некоторые препараты, ингибирующие ксантиноксидазу, такие как аллопуринол, фебуксостат и топилоксостат, эффективны в ингибировании синтеза мочевой кислоты из гипоксантина и ксантина и в снижении концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови [5–7]. Существуют очевидные побочные эффекты, связанные с длительным применением этих ингибиторов, в связи с чем приобретает особое значение поиск альтернативных наиболее безопасных (с минимальными побочными эффектами) ингибиторов ксантиноксидазы [9].

Недавние исследования доказали, что флавоноиды, фенольные кислоты, терпены, алкалоиды и другие соединения способствуют снижению уровня мочевой кислоты, но стоимость извлечения природных активных веществ чрезвычайно высока, что ограничивает их промышленное применение. Биологически активные

пептиды, снижающие уровень мочевой кислоты, обладают такими характеристиками, как высокая эффективность, безопасность, легкая абсорбция, стабильность и специфичность, которые привлекли внимание исследователей в последние годы. Было обнаружено, что некоторые биологически активные пептиды не только обладают ингибирующей ксантиноксидазную активностью *in vitro*, но и обладают активностью, снижающей уровень мочевой кислоты *in vivo* [9].

Выделение биологически активных пептидов из натуральных источников микробиологического, растительного и животного происхождения стало одной из альтернатив использования лекарственных веществ ингибиторов ксантиноксидазы в последние годы. На сегодняшний день известны антигиперурикемические пептиды, извлеченные из: 1) белков животного происхождения: молочных белков (казеина, сывороточных протеинов альбумина и глобулина, лактоферрина), белков яйца (овальбумина, овотрансферрина и др.), белков мышечной ткани (миозина, актина, миоглобина и др.), а также белков побочных продуктов переработки животных и морепродуктов (коллагена, гемоглобина и др.); 2) белков растительного происхождения: белков тканей растений и грибов [8, 10–16, 7–18]. Ферментолитаты микробной биомассы являются потенциальными источниками биопептидов, используемых в технологиях пищевых функциональных ингредиентов [38]. Пептиды вступают в реакцию с другими активными веществами с образованием биологически активных комплексов, которые могут быть использованы в составе функциональных продуктов питания [39].

Количество биологически активных пептидов с ингибирующей ксантиноксидазную активностью *in vitro* и снижающих уровень мочевой кислоты *in vivo*, используемых в качестве лекарственных препаратов незначительно. Получение и использование нативных биологически активных пептидов имеют и недостатки: не всегда представляется возможным выделить аналогичные биологически активные пептиды, т. к. натуральное сырье отличается различным химическим составом, процесс гидролиза белка-предшественника пептидов зависит от многих факторов и др. Поэтому, в качестве лекарственных препаратов используют синтезированные биологически активные пептиды. Выявление аминокислотных последовательностей в нативных пептидах, ингибирующих ксантиноксидазную активность *in vitro* и снижающих уровень мочевой кислоты, позволяет создать на их основе новые эффективные биологически активные пептиды с вышеуказанной биологической активностью.

Цель исследования – идентифицировать устойчивые аминокислотные паттерны, обуславливающие ингибирующую ксантиноксидазную активность пептидов, предложить на их основе новые антигиперурикемические пептиды с доказанной посредством использования методологии предиктивной аналитики *in silico* эффективностью.

### Объекты и методы исследования

#### Разработка программы поиска, идентификации и количественной оценки совпадающих аминокислотных сочетаний (паттернов), характеризующих антигиперурикемическую активность пептидов.

Авторы данного исследования разработали программу поиска, идентификации и количественной оценки повторяющихся сочетаний аминокислотных остатков в целевых пептидных последовательностях. Для написания программы использовали язык программирования Python. Разработанная программа позволяет выявлять паттерны длиной от 2 и более символов (аминокислот) в цепи среди заданного набора аминокислотных последовательностей (цепочек), что является ключевым при исследовании биологически значимых доменов и их функций в разнообразных белках и пептидах.

Вследствие обзора иностранных источников научной литературы был сформирован массив данных, содержащих набор известных (ранее выявленных) пептидов, которые проявили себя как ингибиторы ксантиноксидазы. В качестве входных данных использовали массив, состоящий из 90 уникальных аминокислотных последовательностей, представленных в формате однобуквенного кода.

После ввода в программную среду Python массива данных выполнялось внесение пептидных последовательностей в словарь программы. Для проверки уникальности данных элементов массива выполняли поиск дубликатов и их удаление, после чего уникальные элементы массива выводили в виде табличных данных. В цикле программы методом перебора выполняли попарное сравнение уникальных последовательностей по заданному критерию (наличие в последовательности совпадающих сочетаний 2 и более символов). Для определения максимально совпадающих сочетаний символов использовали метод поиска подстрок, при нахождении ранее выявленного совпадения символов в массиве происходил пересчет и вывод в табличном виде количества идентифицированных повторений.

Посредством алгоритма программы с применением комбинаторики были сгенерированы комбинации символьных сочетаний (сочетаний аминокислот, встречающихся 5 и более раз в антигиперурикемических пептидах), выявленных посредством биоинформатического анализа. Комбинации символьных сочетаний представляли собой новые аминокислотные последовательности, обладающие потенциальной ингибирующей активностью в отношении ксантиноксидазы. Комбинации генерировались в лексикографическом порядке, алгоритм работал с порядковыми индексами элементов множества. Множество состояло из 16 элементов – ранее выявленных сочетаний аминокислот, наиболее часто встречающихся в известных антигиперурикемических пептидах. Комбинации генерировались по критерию длины (размера), целевые длины комбинаций – от 2 до 3.

#### Оценка физико-химических свойств пептидов.

Количество аминокислот в цепи, изоэлектрическая точка, заряд при нейтральном pH и молекулярная масса пептидов были теоретически рассчитаны посредством мощностей онлайн-предиктора [40].

Индекс гидрофобности (IG\_fob) пептидов рассчитывали по шкале относительной гидрофобности аминокислотных остатков J. Kyte и R. E. Doolittle [41]. При IG\_fob > 0 пептид считался гидрофобным, при IG\_fob < 0 – гидрофильным.

**Оценка ингибирующей ксантиноксидазной активности пептидов.** В качестве количественного индикатора ингибирующей активности пептидов использовали концентрацию полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>), при которой действие ингибитора достигает 50 % ингибирования целевой функции.

Посредством алгоритма программы, созданной N. Kumar с соавторами [43], для новых пептидных последовательностей, идентифицированных посредством алгоритма, рассчитаны pIC<sub>50</sub>, а далее с помощью формулы 1 для всех исследуемых последовательностей рассчитаны IC<sub>50</sub>.

$$IC_{50} = \text{antilog} \times (pIC_{50}) \quad (1)$$

где IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования, pIC<sub>50</sub> – логарифмическое преобразование IC<sub>50</sub> с обратным знаком.

Для перевода pIC<sub>50</sub> в IC<sub>50</sub> использовали программу, разработанную A. Thakur и V. Mehta [44].

**Оценка общей и целевой биологической активности пептидов. Оценка токсичности пептидов.** Биологическую активность пептидов оценивали посредством использования инструмента Peptide Ranker. Для оценки токсичности, антиоксидантной активности, ингибирующей дипептидилпептидазу-4 активности, антимикробной активности (антибактериальной, противовирусной, противогрибковой), активности, определяющей кворум, использовали универсальную архитектуру глубокого обучения для прогнозирования биоактивных пептидов UniDL4BioPer [44].

**Оценка фармакокинетических свойств пептидов.** Вследствие перевода последовательностей аминокислот из однобуквенного кода в формат SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) по методологии A. Daina и др. [45] была рассчитана ингибирующая активность пептидов в отношении изоферментов цитохрома P450, которые играли важную роль в метаболизме многих лекарственных препаратов и других веществ в организме человека (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). Определили, являются ли пептиды субстратом P-гликопротеина (P-gp).

### Результаты и их обсуждение

**Исследование влияния структуры и физико-химических свойств известных пептидов на ингибирующую ксантиноксидазную активность.** Вследствие

анализа источников научной литературы выявили 90 биологически активных пептидов, обладающих ингибирующей ксантиноксидазной активностью. Выявленные пептиды вошли в массив данных, в пределах которого для каждого из пептидов были оценены количество и состав аминокислот в цепи, а также основные физико-химические свойства – изоэлектрическая точка, заряд при нейтральном рН и молекулярная масса, индекс гидрофобности.

Среди массива было обнаружено 25 тетрапептидов, 13 гексапептидов, 12 три- и пентапептидов, 8 дипептидов, 7 декапептидов, 3 гепта- и нонапептида, 2 окта- и ундекапептида и 1 додека-, тридека- и тетрадекапептида. Среди анализируемых пептидов наиболее часто встречались последовательности с 6, 5, 4 и 3 аминокислотными остатками в цепи. Самый длинный биологически активный пептид из выборки состоял из 14 аминокислотных остатков, самый короткий – из 2 аминокислотных остатков. Средняя длина анализируемых биологически активных пептидов составила 5 аминокислотных остатков.

Доказано, что аминокислотная последовательность пептида определяет то, какой тип биологической активности будет проявлять молекула, вследствие чего в данном исследовании массив данных был проанализирован с точки зрения структуры аминокислотной последовательности [10, 44, 45].

Встречаемость (частота появления) аминокислот в пептидных массивах была следующая: серин – 111, пролин – 60, триптофан – 47, фенилаланин – 44, аланин – 29, глицин – 29, лейцин – 28, изолейцин – 27, валин – 27, тирозин – 24, аргинин – 23, глутаминовая кислота – 21, аспарагиновая кислота – 17, лизин – 17, аспарагин – 16, треонин – 14, гистидин – 12, метионин – 10, глутамин – 10 и цистеин – 9.

Серин, пролин, триптофан, фенилаланин, аланин, глицин показали наиболее высокую встречаемость в выборке. Лейцин, изолейцин, валин, тирозин, аргинин и глутаминовая кислота демонстрировали среднюю встречаемость в массиве. Низкая встречаемость была характерна для аспарагиновой кислоты, лизина, аспарагина, треонина, гистидина, метионина, глутамина и цистеина.

Большинство идентифицированных на сегодняшний день антигиперурикемических пептидов содержали тирозин, фенилаланин, пролин, изолейцин и лейцин с вкраплениями полярных остатков лизина, аргинина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, что характеризует эти молекулы как превосходные антиоксиданты в системе [11].

Результаты исследований А. В. Nongonierma и др. показали, что ингибирующую ксантиноксидазную активность проявляли только триптофансодержащие пептиды, а другие аминокислоты, находящиеся в аминокислотной последовательности, не усиливали ингибирующую активность триптофана и сами не обладали свойствами ингибитора ксантиноксидазы [47].

Массив данных был представлен 48 гидрофобными и 42 гидрофильными пептидами. Кислотные остатки содержали только 3 пептида из выборки, основные остатки присутствовали у 13 пептидов, а нейтральные – у 31 пептида, что согласуется с данными о том, что пептиды гидрофобной природы с алифатическими и ароматическими цепями оказывают значительное влияние на молекулярные взаимодействия, обеспечивающее требуемую активность против ксантиноксидазы, и что нейтральные или слабощелочные пептиды, а не кислые пептиды, с большей вероятностью выступают ее ингибиторами [47, 48].

Пептиды, содержащие остаток триптофана, обладали относительно высокой ингибирующей ксантиноксидазной активностью, а расположение аминокислотного остатка оказывало определенное влияние на ингибирующую активность пептида. Увеличение количества остатков триптофана может эффективно улучшать ингибирующую ксантиноксидазную активность пептидов [48]. Введение триптофана в среднее положение пептида может усилить его активность как ингибитора. При условии умеренной длины последовательности пептиды, содержащие больше остатков триптофана, могут лучше встраиваться в активный карман ксантиноксидазы и связываться с критическими остатками, и таким образом демонстрируют более высокую ингибирующую активность [32]. М. Ноу с соавторами продемонстрировали, что пептиды с остатком триптофана на С-конце ингибируют ксантиноксидазой [26]. Триптофан-содержащие пептиды обладают значительной ингибирующей активностью в отношении ксантиноксидазы, среди всех аминокислот триптофан – единственная аминокислота, которая образуется из индола. Индольное кольцо обладает значительными гидрофобными свойствами, что облегчает взаимодействия «белок-белок», «белок-пептид» или «белок-биомолекула» посредством гидрофобных эффектов,  $\pi$ - $\pi$  укладки и сил Ван-дер-Ваальса и позволяет выступать в качестве донора водородных связей при связывании и распознавании белка [49]. Ингибирующие свойства триптофана объясняются его сходством с лекарственными ингибиторами ксантиноксидазы, которые имеют ксантиноподобные структуры: триптофан с индольной группой имеют сходную с препаратом аллопуринол кольцевую структуру С6 и С5, при этом тирозин и фенилаланин не ингибируют ксантиноксидазы, предположительно, из-за того, что они не обладают ксантиноподобными структурными особенностями [26].

Остатки аминокислот Glu802, Glu1261 и Arg880 в молибденовом центре полости фермента ксантиноксидазы играют ключевую роль в катализе окисления ксантина, тогда как некоторые остатки на входе в полость (Leu648, Phe649, Phe914, Phe1009, Val1011, Phe1013 и Leu1014) модулируют окисление ксантина, проникновение в центр небольших молекул, включая субстраты или ингибиторы. [15].

Авторы Н. Е. Weiwei и S. U. Guowan установили, что домен молибдена ксантиноксидазы состоит из Phe649, Asn768, Glu802, Leu873, Arg880 и Phe914, Phe1009, Thr1010, Leu1014 и Glu1261, среди которых Glu802, Leu873, Arg880 и Pro1076 играли ключевую роль в ингибирующей реакции [50]. Обнаружили, что аминокислоты Glu802, Leu873, Arg880 и Pro1076 образуют активный сайт ксантиноксидазы, и ингибирующие фермент пептиды, вероятно, взаимодействуют с ними.

В ходе ряда исследований было доказано, что остатки Glu802, Phe1009 и Arg880 могут играть ключевую роль в каталитической реакции ксантиноксидазы; ключевыми межмолекулярными силами, ингибирующими ее активность, могут быть особые типы водородных связей, включая взаимодействия углеродводородных связей и взаимодействия зарядов притяжения. Каталитические ингибиторы обычно связываются с активным центром молибден-молибдоптерина, образуя множественные взаимодействия с его ключевыми аминокислотными остатками, участвующими в катализе, полностью перекрывается (блокируется) канал, ведущий к центру молибдена и окружающему его пространству, что препятствует связыванию ксантина [15].

Согласно результатам, полученным Q. Li, C. Shi и др. известно, что аминокислотные остатки Arg880 и Glu802 в ксантиноксидазе, образуют с пептидами гидрофобные связи, а Leu873 и Pro1076 соединяются с пептидами благодаря силам Ван-дер-Ваальса [51]. Однако один и тот же аминокислотный остаток не всегда приводит к одинаковому взаимодействию. Например, аминокислотный остаток Glu802 в ксантиноксидазе образовывал с пептидами AM и AL как водородную связь, так и гидрофобное взаимодействие, при этом с пептидами PM и GL он образовывал только гидрофобное взаимодействие.

Известны результаты исследований, которые свидетельствуют о том, что биологически активные пептиды, содержащие фенилаланин, обладали более сильной ингибирующей активностью, чем биологически активные пептиды, содержащие триптофан, что связано со строением ксантиноксидазы. Активный центр фермента ксантиноксидазы состоит из гидрофобного мешка, следовательно, пептиды, содержащие больше гидрофобных аминокислот, могут легко попадать в гидрофобную зону активного центра ксантиноксидазы [47].

Н. Е. Weiwei с соавторами доказали, что щелочные аминокислоты играют ключевую роль в ингибирующей активности дипептидов, содержащих фенилаланин и щелочные аминокислоты, и обладают сильной ингибирующей ксантиноксидазной активностью [48]. Биологически активные пептиды-ингибиторы ксантиноксидазы содержали по меньшей мере один конец ароматической аминокислоты. Известно, что N-концевое положение остатков ароматических аминокислот – триптофана, фенилаланина, тирозина,

гистидина – обеспечивало высокую активность полипептидов, ингибирующих ксантиноксидазы [52].

В исследованиях Y. Xu, H. Gong и др. выявлено, что все ингибирующие ксантиноксидазные пептиды имели гидрофобные или ароматические аминокислоты на C- или N-конце [53]. Ингибирование ксантиноксидазы обусловлено взаимодействием различных аминокислотных остатков или химических групп, которые могут вступать в контакт с активным центром фермента, что подтверждено X.-N. Huang и др. [54], которые выявили, что полученные из природных белков биологически активные пептиды ингибиторы-ксантиноксидазы содержали ароматические аминокислоты и аминокислоты с разветвленной цепью.

Ксантиноксидаза генерировала активную форму кислорода путем использования молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [55]. Фенольные и индольные группы выступали донорами водорода, аминокислоты, содержащей ароматические остатки, проявляли значительное антиоксидантное действие. Ароматические аминокислоты с заряженными остатками взаимодействовали с ионами металлов и ограничивали окислительную активность. Активность пептидов усиливалась за счет снижения уровня активных форм кислорода. Пептиды с остатками тирозина и (или) гистидина, пролина и (или) фенилаланина обладали высокой антиоксидантной активностью [56, 57].

Функциональные группы – гидроксильные группы тирозина или серина, амидная группа аспарагина или глутамина или тиоловая группа цистеина, могли образовывать водородные связи или другие типы химических взаимодействий с активным центром ксантиноксидазы. Аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями, такие как валин, изолейцин или фенилаланин, могли вступать в гидрофобные взаимодействия с соответствующими участками активного центра ксантиноксидазы, например изменяя его пространственную структуру и тем самым ограничивая его активность [8, 26, 56]. Гидрофобный карман, образованный аминокислотными остатками Leu873, Phe914 и Phe1009 и выстланный Glu802, Leu873, Arg880, Phe914, Phe1009 и Glu1261, вблизи активного центра ксантиноксидазы действует как критический структурный домен, доступный для пептидов с большим количеством гидрофобных пептидов [26].

Средняя молекулярная масса пептидов массива составила 683,5 Да, что подтверждает тезис о том, что низкая молекулярная масса пептидов (до 1000 Да) может обуславливать их ингибирующую активность в отношении ксантиноксидазы. Это связано с наибольшей активностью низкомолекулярных пептидов в реакциях с участками-мишенями ксантиноксидазы, по сравнению с высокомолекулярными пептидами [10]. Молекулярная масса зарегистрированных пептидов, ингибирующих ксантиноксидазу, в настоящее время составляет < 1 кДа, большинство из них находится в диапазоне молекулярных масс от 400 до 800 Да [12].

Пептиды с низкой молекулярной массой, гидрофобные, содержащие ароматические аминокислотные остатки, нейтральные или слабощелочные потенциально обладают высокой ингибирующей ксантиноксидазной активностью.

Идентификация и анализ *in silico* новых пептидов антигиперурикемического профиля. Вследствие использования разработанной авторами статьи программы, написанной на языке Python, выявили 194 символьных сочетания (сочетания аминокислот), после чего методом пузырька словарь с данными отсортировали по частоте повторяющихся сочетаний символов (от 5 и более повторений). Были получены 16 символьных сочетаний (сочетаний аминокислот), выведенных в заданном диапазоне длин (от 2 символов в цепи) с указанием количества повторений. В массиве: каждое из 8 сочетаний аминокислот AG, IW, PE, PG, SF, VY, WP, VYP встречалось 5 раз; каждое из 4 сочетаний аминокислот GP, PI, PW, PFP – 6 раз; сочетание аминокислот YP – 7 раз; каждое из 2 сочетаний аминокислот PF и PP – 8 раз; сочетание аминокислот FP – 13 раз. Изучение выходных данных позволило выявить и другие совпадающие сочетания аминокислот различной длины. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего исследования структурных особенностей и связанных с ними функциональных свойств пептидных последовательностей, в том числе в отношении молекулярных мишеней, таких как ксантиноксидаза.

Вследствие применения комбинаторики на основе имеющихся 16 символьных сочетаний созданы их случайные комбинации с длиной последовательности от 5 до 7 символов. Комбинации символьных соче-

таний представляли собой новые аминокислотные последовательности, обладающие потенциальной ингибирующей активностью в отношении ксантиноксидазы. Комбинации генерировали в лексикографическом порядке, алгоритм работал с порядковыми индексами элементов множества. Множество состояло из 16 элементов (ранее выявленных сочетаний аминокислот, наиболее часто встречающихся в антигиперурикемических пептидах): PG, SF, VY, VYP, WP, GP, PFP, PI, PW, YP, PF, PP, FP. Комбинации генерировали по критерию длины (размера) комбинации (целевые длины от 2 до 3). В результате получены 182 тетра-, 56 пента-, 2186 гекса-, 7644 гептапептида, которые были посредством использования методов *in silico* аналитически проверены на предмет их эффективности как ингибиторов ксантиноксидазы.

Первично каждая из групп пептидов была проверена посредством использования расчетных методов *in silico* с точки зрения потенциальной биологической активности. Вследствие проверки отобраны биологически активные пептиды, вероятность биологической активности которых была от 0,95 до 1 (при  $max = 1$ ).

Далее биологически активные пептиды последовательно проверены на антиоксидантную активность, токсичность, антимикробную активность (антивирусную, антибактериальную, антигрибковую), активность кворума, ингибирующую активность дипептидилпептидазы IV (DPP IV), на средство в отношении изоферментов цитохрома P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) и принадлежность к классу субстратов P-гликопротеина. В таблице 1 представлены результаты анализа функциональных свойств полученных пептидов.

Таблица 1. Функциональные свойства пептидов

Table 1. Functional profile of peptides

Пептид	Длина пептида	Концентрация полумаксимального ингибирования ксантиноксидазы ( $IC_{50}$ , мкМ)	Прогнозируемая вероятность биологически активного пептида (ПВБА)	Токсичность	Антиоксидантная активность	Антибактериальная активность	Антивирусная активность	Противогрибковая активность	Ингибирующая активность дипептидилпептидазы IV (DPP IV)	Активность, ингибирующая микробиологический кворум (QS)	Принадлежность к классу субстратов P-гликопротеина (P-gp)	Принадлежность к классу соединений CYP1A2	Принадлежность к классу соединений CYP2C19	Принадлежность к классу соединений CYP2C9	Принадлежность к классу соединений CYP2D6	Принадлежность к классу соединений CYP3A4
WPSF	4	0,30	0,95	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SFWPFP	6	0,30	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
WPPWWD	6	0,46	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
WPPFPWD	6	0,46	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
PFPFPWD	7	0,46	0,97	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
GPWP	4	0,48	0,95	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
WPPG	4	0,48	0,95	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PPPW	4	0,59	0,96	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PPWP	4	0,59	0,96	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

Примечание. Данные отсортированы по критерию  $IC_{50}$  от наибольшей активности к наименьшей.

Продолжение таблицы 1.

Пептид	Длина пептида	Концентрация полумаксимального ингибирования ксантинооксидазы ( $IC_{50}$ , мкМ)	Прогнозируемая вероятность биологически активного пептида (ПВБА)	Токсичность	Антиоксидантная активность	Антибактериальная активность	Антивирусная активность	Противогрибковая активность	Ингибирующая активность дипептидилпептидазы IV (DPP IV)	Активность, ингибирующая микробиологический кварум (QS)	Принадлежность к классу субстратов Р-гликопротеина (Р-gp)	Принадлежность к классу соединений СУР1А2	Принадлежность к классу соединений СУР2С19	Принадлежность к классу соединений СУР2С9	Принадлежность к классу соединений СУР2D6	Принадлежность к классу соединений СУР3А4
PGWPPW	6	0,62	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
WPGPF	6	0,62	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
WPGPPFP	7	0,62	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
WPGPPW	6	0,62	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
AGWPPW	6	0,68	0,97	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
WPPWPF	6	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
WPPFPFP	7	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
WPPFPFP	7	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
WPPWFP	6	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
WPPFPFW	7	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
WPPFPFP	6	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
PWPFPP	6	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
PWPFPP	6	0,78	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
WPPFPFP	6	0,78	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
PWPFPP	5	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
WPPFP	5	0,78	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
PFPWP	5	0,78	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
FPWP	4	0,78	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
PWWP	4	0,78	0,98	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
PFWP	4	0,78	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
PFPW	4	0,78	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
IWWPPW	6	0,93	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
IWPFPPFP	7	0,93	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
IWWPFP	6	0,93	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
IWPWPF	6	0,93	0,99	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
IWPFPP	6	0,93	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
WPPFPYYP	7	0,93	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
WPPWYP	6	0,93	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
PWYPPFP	6	0,93	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
WPPIPW	6	0,93	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
WPPFVW	6	0,93	0,97	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
WPIW	4	0,94	0,97	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
FPIW	4	0,94	0,96	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
IWPFP	5	0,94	0,97	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
YPPW	4	0,94	0,95	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PPPF	4	1,00	0,96	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
FPPF	4	1,37	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
PFPFP	5	1,37	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
PFPYPPFP	7	1,62	0,98	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
PWIW	4	2,45	0,95	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

Примечание: S – серин, P – пролин, W – триптофан, F – фенилаланин, A – аланин, G – глицин, L – лейцин, I – изолейцин, V – валин, Y – тирозин, R – аргинин, E – глутаминовая кислота, D – аспарагиновая кислота, K – лизин, N – аспарагин, T – треонин, H – гистидин, M – метионин, Q – глутамин и C – цистеин.

Note: S – serine, P – proline, W – tryptophan, F – phenylalanine, A – alanine, G – glycine, L – leucine, I – isoleucine, V – valine, Y – tyrosine, R – arginine, E – glutamic acid, D – aspartic acid, K – lysine, N – asparagine, T – threonine, H – histidine, M – methionine, Q – glutamine, C – cysteine.

Отбирали обладающие антиоксидантной и антимикробной активностью нетоксичные биологически активные пептиды, способные подавлять межклеточную коммуникацию бактерий («quorum sensing», «чувство кворума», QS) [58]. При лечении гиперурикемии, сопровождающей разного рода заболевания, в том числе и подагру, может быть полезно свойство пептида проявлять антимикробную активность, т. к. на сегодняшний день существуют результаты исследований, подтверждающие влияние дисбиоза кишечной микробиоты на патогенез подагры [59]. Все идентифицированные биологически активные пептиды обладали антимикробной активностью разного спектра, кроме того, они были способны влиять на активность микробиологического кворума, что характеризует полученные пептиды как перспективных кандидатов на роль терапевтических антигиперурикемических пептидов. YPPW – единственный из пептидов, который не обладал противогрибковой активностью. Пептиды PPPW, PPWP, PPPF, YPPW не обладали активностью в отношении микробиологического кворума.

При гиперурикемии развиваются сопутствующие патологические состояния, одним из которых является сахарный диабет 2 типа, поэтому пептиды были проверены на ингибирующую активность DPP IV, которая является основной мишенью при диабете [60]. Все 49 биологически активных пептидов проявляли активность в отношении DPP IV, что расширяет профиль их действия и характеризует в качестве потенциально перспективных кандидатов.

Далее пептиды были проверены на предмет того, какие изоферменты цитохрома P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) их метаболизируют, а также на предмет принадлежности к классу субстратов P-гр. Изоферменты цитохрома P450 играли важную роль в метаболизме различных лекарственных препаратов и иных веществ в организме. Каждый из указанных ферментов обладал своей уникальной специфичностью и отвечал за метаболическую активацию или детоксикацию определенных классов лекарственных препаратов и соединений. CYP3A4 – самый распространенный фермент, ответственный за метаболизм около 50 % всех лекарственных препаратов разного спектра (антибиотики, антигистаминные препараты, противосудорожные препараты, статины и многие другие) и он являлся наиболее вероятным кандидатом для каталитического метаболизма созданных пептидов. Метаболизм пептидов мог происходить не только через ферменты CYP, но и через другие механизмы (например посредством протеаза и пептидаза).

Ингибиторы P-гр – мембранный белок, выполняющий функцию клеточного транспорта различных веществ. Из выборки 6 тетрапептидов (PPWP, FPWP, PFWP, PFPW, FPIW, FPPF), 1 пентапептид (PFPFP), 15 гексапептидов (SFWPFP, WPPWWD, WPPFWD, WPPWPF, WPPWFP, WPPFFP, PWPFFP, IWWPPW, IWWPFP, IWPWPF, IWPFFP, WPPWYP, PWYPFP,

WPPIPW, WPPFVW) и 8 гептапептидов (PFPFPWD, WPGPPFP, WPPFPPF, WPPFPFP, WPPFPFW, IWPFPFP, WPPFPYP, PFPYFPF) оказались субстратами P-гр. Соответственно, указанные пептиды могут быть транспортированы через клеточную мембрану посредством данного мембранного белка. Транспорт через P-гр может влиять на фармакокинетику пептида, его доступность к мишеням в организме и общую эффективность. Знание о том, что пептид является субстратом P-гр, может быть полезно для предотвращения взаимодействия пептида с лекарственными препаратами, которые также могут быть субстратами или ингибиторами P-гр.

75 % предложенных пептидов метаболизируются CYP3A4: 5 гексапептидов (PWWP, PFWP, WPIW, FPIW, PWIW), 4 пентапептида (PWPFP, WPPFP, PFPWP, IWPFP), 21 гексапептид (SFWPFP, WPPWWD, WPPFWD, PGWPPW, WPGFPF, WPGPPW, AGWPPW, WPPWPF, WPPWFP, WPPFFP, PWPFFP, PWPFFP, WPPFPP, IWWPPW, IWWPFP, IWPWPF, IWPFFP, WPPWYP, PWYPFP, WPPIPW, WPPFVW) и 7 гептапептидов (WPGPPFP, WPPFPPF, WPPFPFP, WPPFPFW, IWPFPFP, WPPFPYP, PFPYFPF). CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 не были определены как основные ферменты метаболизма идентифицированных пептидов. В качестве основного изофермента, играющего ключевую роль в метаболизме пептидов, был определен CYP3A4.

Для порядка 50 % полученных пептидных последовательностей были характерны принадлежность к субстратам P-гр и одновременно с этим участие в их метаболическом пути изоферментов CYP2C9 и CYP3A4. Пептиды, которые не относились ни к субстратам P-гр, ни к соединениям, которые метаболизируются одним изоферментом цитохрома P450, не были удалены из выборки в целях дальнейшего изучения их фармакокинетических свойств.

Все предложенные антигиперурикемические пептиды обладали потенциально высокой ингибирующей ксантиноксидазной активностью, что было подтверждено расчетными значениями  $IC_{50}$ , вычисленными с применением методов *in silico*.

Наибольшей ингибирующей ксантиноксидазной активностью обладали тетрапептид WPSF и гексапептид SFWPFP, для которых расчетная  $IC_{50}$  составила 0,30 мкМ. Гексапептидам WPPWWD и WPPFWD, и гептапептиду PFPFPWD с расчетной  $IC_{50}$  0,46 мкМ, а также тетрапептидам GPWP и WPPG ( $IC_{50}$  = 0,48 мкМ) была свойственна высокая активность против ксантиноксидазы.

Расчетная (прогнозная) концентрация полумаксимального ингибирования всех идентифицированных пептидов была ниже 1 мкМ, за исключением тетрапептидов PPPF, FPPF и PWIW, пентапептида PFPFP и гептапептида PFPYFPF. Самая высокая расчетная (прогнозная)  $IC_{50}$  в выборке соответствовала 2,45 мкМ и была характерна для тетрапептида PWIW, что ниже  $IC_{50}$  аллопуринола, для которого полумаксимальная

концентрация ингибирования, рассчитанная по той же методологии, равнялась 2,60 мкМ. Пептиды, предлагаемые в качестве потенциальных терапевтических агентов при гиперурикемии, более эффективны, чем синтетические препараты, применяемые при стандартной терапии гиперурикемии. Терапевтический спектр рассматриваемых пептидных препаратов по прогнозу *in silico* существенно выше, чем у любого другого класса препаратов синтетической природы.

С целью описания и идентификации пептидов изучены физико-химические свойства молекул, рассчитана молекулярная масса, изоэлектрическая точка и заряд молекул при нейтральной реакции среды, индекс гидрофобности, определена брутто-формула (табл. 2).

Вследствие анализа индекса гидрофобности выявили, что в выборке преобладали гидрофильные пеп-

тиды, при этом гидрофобные пептиды составляли порядком 25 % от всей выборки, что противоречит гипотезе о преимущественно гидрофобной природе антигиперурикемических пептидов [26, 53].

Наиболее часто встречающимися аминокислотными остатками в выборке выступили пролин, триптофан, фенилаланин, которые составили 48, 24, 17 % соответственно. В пептидах встречались и другие аминокислотные остатки с меньшей частотой, в порядке убывания частоты (встречаемости) в выборке: изолейцин, глицин, тирозин, аспарагиновая кислота, серин, валин, аланин. Выявленные в ходе анализа закономерности в части структурных свойств пептидов и их взаимосвязи с активностью против ксантиноксидазы имели пересечения с результатами, полученными авторами иностранных научных статей [8, 26, 51, 55].

Таблица 2. Физико-химические свойства пептидов

Table 2. Physicochemical properties of peptides

Пептид	Длина пептида	Молекулярная масса, Да	Брутто-формула	Изоэлектрическая точка (pI)	Заряд при pH = 7 (Z)	Индекс гидрофобности ( $I_{G\_fob}$ )
WPSF	4	535,6	C28H33N5O6	5,99	-0,004	-0,5
SFWPFP	6	779,89	C42H49N7O8	5,58	-0,007	0,7
WPPWWD	6	885,98	C47H51N9O9	2,98	-1,003	-9,4
WPPFWD	6	846,94	C45H50N8O9	2,98	-1,003	-5,7
PFPFPWD	7	905,02	C48H56N8O10	2,98	-0,999	-3,6
GPWP	4	455,52	C23H29N5O5	5,81	-0,002	-4,5
WPPG	4	455,52	C23H29N5O5	5,87	-0,004	-4,5
PPPW	4	495,58	C26H33N5O5	5,91	0,000	-5,7
PPWP	4	495,58	C26H33N5O5	6,30	0,000	-5,7
PGWPPW	6	738,84	C39H46N8O7	5,91	0,000	-7,0
WPGPFP	6	699,81	C37H45N7O7	5,70	-0,004	-3,3
WPGPPFP	7	796,92	C42H52N8O8	5,70	-0,004	-4,9
WPGPPW	6	738,84	C39H46N8O7	5,31	-0,004	-7,0
AGWPPW	6	712,81	C37H44N8O7	5,42	-0,002	-3,6
WPPWPF	6	828,97	C46H52N8O7	5,99	-0,004	-3,8
WPPFPFP	7	887,05	C49H58N8O8	5,99	-0,004	-1,7
WPPFPFP	7	887,05	C49H58N8O8	5,70	-0,004	-1,7
WPPWFP	6	828,97	C46H52N8O7	5,70	-0,004	-3,8
WPPFPFW	7	926,08	C51H59N9O8	5,31	-0,004	-5,4
WPPFFP	6	789,93	C44H51N7O7	5,70	-0,004	-0,1
PWPPFP	6	789,93	C44H51N7O7	6,30	0,000	-0,1
PWPPFP	6	739,87	C40H49N7O7	6,30	0,000	-4,5
WPPFPFP	6	739,87	C40H49N7O7	5,70	-0,004	-4,5
PWPFP	5	642,76	C35H42N6O6	6,30	0,000	-2,9
WPPFP	5	642,76	C35H42N6O6	5,70	-0,004	-2,9
PFPWP	5	642,76	C35H42N6O6	6,30	0,000	-2,9
FPWP	4	545,64	C30H35N5O5	5,62	-0,005	-1,3
PWWP	4	584,68	C32H36N6O5	6,30	0,000	-5,0
PFPWP	4	545,64	C30H35N5O5	6,30	0,000	-1,3
PFPW	4	545,64	C30H35N5O5	5,91	0,000	-1,3
IWWPPW	6	884,05	C49H57N9O7	5,49	-0,001	-1,4
IWPPFPFP	7	903,09	C50H62N8O8	5,89	-0,001	4,4
IWWPFP	6	845,01	C47H56N8O7	5,89	-0,001	2,3
IWPWPF	6	845,01	C47H56N8O7	6,18	-0,001	2,3

Продолжение таблицы 2.

Пептид	Длина пептида	Молекулярная масса, Да	Брутто-формула	Изоэлектрическая точка (pI)	Заряд при pH = 7 (Z)	Индекс гидрофобности ( $I_{G\_fob}$ )
IWPFFP	6	805,97	C45H55N7O7	5,89	-0,001	6,0
WPPFPYP	7	903,05	C49H58N8O9	5,66	-0,004	-5,8
WPPWYP	6	844,97	C46H52N8O8	5,66	-0,004	-7,9
PWYFPF	6	805,93	C44H51N7O8	5,99	-0,001	-4,2
WPPIPW	6	794,95	C43H54N8O7	5,31	-0,004	-2,1
WPPFVW	6	830,98	C46H54N8O7	5,31	-0,004	2,0
WPIW	4	600,72	C33H40N6O5	5,31	-0,004	1,1
FPIW	4	561,68	C31H39N5O5	5,23	-0,005	4,8
IWPFP	5	658,8	C36H46N6O6	5,89	-0,001	3,2
YPPW	4	561,64	C30H35N5O6	5,15	-0,008	-5,4
PPPF	4	456,54	C24H32N4O5	6,59	0,000	-2,0
FPPF	4	506,60	C28H34N4O5	5,92	-0,005	2,4
PFPFP	5	603,72	C33H41N5O6	6,30	0,000	0,8
PFPYFPF	7	864,01	C47H57N7O9	5,99	-0,001	-2,1
PWIW	4	600,72	C33H40N6O5	5,91	0,000	1,1

Примечание: S – серин, P – пролин, W – триптофан, F – фенилаланин, A – аланин, G – глицин, L – лейцин, I – изолейцин, V – валин, Y – тирозин, R – аргинин, E – глутаминовая кислота, D – аспарагиновая кислота, K – лизин, N – аспарагин, T – треонин, H – гистидин, M – метионин, Q – глутамин, C – цистеин.

Note: S – serine, P – proline, W – tryptophan, F – phenylalanine, A – alanine, G – glycine, L – leucine, I – isoleucine, V – valine, Y – tyrosine, R – arginine, E – glutamic acid, D – aspartic acid, K – lysine, N – asparagine, T – threonine, H – histidine, M – methionine, Q – glutamine, C – cysteine.

В среднем молекулярная масса анализируемых пептидов была на уровне 723 Да, изоэлектрическая точка – на уровне 5,66, заряд при нейтральном pH – на уровне 0,1.

### Выводы

Проведенное комплексное исследование позволило идентифицировать аминокислотные паттерны, ответственные за ингибирование фермента ксантиноксидазы посредством созданного авторами статьи программного обеспечения на языке Python. Выявленные паттерны послужили основой для создания новых пептидных последовательностей, которые были подвергнуты анализу на предмет различных спектров биологической активности, токсичности и фармакокинетических свойств.

В результате проведенного исследования авторами были идентифицированы 49 нетоксичных антигиперурикемических пептидов с различной длиной аминокислотной последовательности: 21 гексапептид, 15 тетрапептидов, 8 гептапептидов, 5 пентапептидов. Для предложенных пептидов были определены структурные характеристики и основные физико-химические свойства. Это позволило охарактеризовать их как низкомолекулярные соединения гидрофильной (преимущественно) и гидрофобной природы длиной от 4 до 7 аминокислот в цепи. Пептиды содержали в структуре преимущественно аминокислотные остатки пролина, триптофана и фенилаланина, в среднем имели молекулярную массу на уровне 723 Да,

изоэлектрическую точку на уровне 5,66 и отрицательный заряд при нейтральной реакции среды – на уровне 0,1.

Результаты данного исследования являются важным шагом в понимании молекулярных механизмов ингибирования фермента ксантиноксидазы и открывают перспективы для разработки новых антигиперурикемических пептидных препаратов. Для подтверждения эффективности и безопасности предложенных пептидов должны быть проведены дальнейшие исследования методами *in vitro* и *in vivo*. Необходимо проведение дополнительных исследований в целях анализа молекулярных механизмов ингибирования предложенными пептидами целевого фермента.

### Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследованиях и оформлении рукописи.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Contribution

The authors are equally responsible for the research and manuscript.

### Conflict of interest

The authors reported no conflict of interests regarding the publication of this article.

## References/Список литературы

1. Shalnova SA, Deev AD, Artamonova GV, Duplyakov DV, Efanov AYu, Zhernakova YuV, et al. Hyperuricemia and its correlates in the Russian population: ESSE-RF epidemiological study. Rational Pharmacotherapy In Cardiology. 2014;10(2):153–159. (In Russ.). [Гиперурикемия и ее корреляты в российской популяции (результаты эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ) / С. А. Шальнова [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2014. Т. 10. № 2. С. 153–159.]. <https://elibrary.ru/SCOUHN>
2. Zhernakova YuV. Hyperuricemia as risk factor for cardiovascular disease – what’s new? Medical Alphabet. 2020;(13):5–11. (In Russ.). <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-13-5-11>; <https://elibrary.ru/MUQH5O>
3. Yeliseyev MS, Yeliseyeva MYe. Modern aspects of pathogenesis and correction of hyperuricemia and associated conditions. Effective Pharmacotherapy. 2019;15(8):32–40. (In Russ.). <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2019-15-8-32-40>; <https://elibrary.ru/SNGWTM>
4. Li Q, Kang X, Shi C, Li Y, Majumder K, Ninga Z. Moderation of hyperuricemia in rats *via* consuming walnut protein hydrolysate diet and identification of new antihyperuricemic peptides. Food and Function. 2018;9(1):107–116. <https://doi.org/10.1039/c7fo01174a>
5. Lai S-W, Hwang B-F, Kuo Y-H, Liu C-S, Liao K-F. Allopurinol use and the risk of dementia a meta-analysis of case-control studies. Medicine. 2022;101(26):e29827. <http://doi.org/10.1097/md.00000000000029827>
6. van der Pol KH, Koenderink J, van den Heuvel JJMW, van den Broek P, Peters J, van Bunningen IDW, et al. Effects of allopurinol and febuxostat on uric acid transport and transporter expression in human umbilical vein endothelial cells. PLoS ONE. 2024;19(6):e0305906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305906>
7. Matsumoto K, Okamoto K, Ashizawa N, Nishino T. FYX-051: A novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2011;336(1):95–103. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.174540>
8. Li Q, Kang X, Shi C, Li Y, Majumder K, Ninga Z. Moderation of hyperuricemia in rats *via* consuming walnut protein hydrolysate diet and identification of new antihyperuricemic peptides. Food and Function. 2018;9(1):107–116. <https://doi.org/10.1039/c7fo01174a>
9. Mehmood A, Zhao L, Wang C, Nadeem M, Raza A, Ali N, et al. Management of hyperuricemia through dietary polyphenols as a natural medicament. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019;59(9):1433–1455. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1412939>
10. Gao Y-F, Liu M-Q, Li Z-H, Zhang H-L, Hao J-Q, Liu B-H, Li X-Y, et al. Purification and identification of xanthine oxidase inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of  $\alpha$ -lactalbumin and bovine colostrum casein. Food Research International. 2023;169:112882. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112882>
11. Nongonierma AB, Fitzgerald RG. Tryptophan-containing milk protein-derived dipeptides inhibit xanthine oxidase. Peptides. 2012;37(2):263–272. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.030>
12. Qi X, Chen H, Guan K, Sun Y, Wang R, Li Q, et al. Novel xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein: identification, *in vitro* inhibition mechanism and *in vivo* activity validation. Bioorganic Chemistry. 2022;128:106097. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106097>
13. Xu Y, Gong H, Zou Y, Mao X. Antihyperuricemic activity and inhibition mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein by virtual screening. Journal Dairy Science. 2024;107(4):1877–1886. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24028>
14. Ahmed AS, El-Bassiony T, Elmalt LM, Ibrahim HR. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. Food Research International. 2015;74:80–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032>
15. Yu Zh, Cao Y, Kan R, Ji H, Zhao W, Wu S, et al. Identification of egg protein-derived peptides as xanthine oxidase inhibitors: virtual hydrolysis, molecular docking, and *in vitro* activity evaluation. Food Science and Human Wellness. 2022;11(6):1591–1597. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.06.017>
16. Thaha A, Wang B-S, Chang Y-W, Hsia S-M, Huang T-C, Shiau C-Y, et al. Food-derived bioactive peptides with antioxidative capacity, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activity. Processes. 2021;9(5):747. <https://doi.org/10.3390/pr9050747>
17. Bu Y, Wang F, Zhu W, Li X. Combining bioinformatic prediction and assay experiment to identify novel xanthine oxidase inhibitory peptides from Pacific bluefin tuna (*Thunnus Orientalis*). E3S Web of Conferences. 2020;185:04062. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202018504062>
18. Zhang P, Jiang Z, Lei J, Yan Q, Chang C. Novel hemoglobin-derived xanthine oxidase inhibitory peptides: Enzymatic preparation and inhibition mechanisms. Journal of Functional Foods. 2023;102:105459. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105459>
19. Murota I, Taguchi S, Sato N, Park EY, Nakamura Y, Sato K. Identification of antihyperuricemic peptides in the proteolytic digest of shark cartilage water extract using *in vivo* activity-guided fractionation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014;62(11):2392–2397. <https://doi.org/10.1021/jf405504u>

20. Li Y, Kang X, Li Q, Shi C, Lian Y, Yuan E, *et al.* Anti-hyperuricemic peptides derived from bonito hydrolysates based on in vivo hyperuricemic model and in vitro xanthine oxidase inhibitory activity. *Peptides*. 2018;107:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.001>
21. Hu X, Zhou Y, Zhou S, Chen S, Wu Y, Li L, *et al.* Purification and identification of novel xanthine oxidase inhibitory peptides derived from round scad (*Decapterus Maruadsi*) protein hydrolysates. *Marine Drugs*. 2021;19(10):538. <https://doi.org/10.3390/md19100538>
22. Song M. Screening of xanthine oxidase inhibiting peptides in meat Protein of bluespot mackerel based on ligand fishing. BoHai University. 2020. [Internet]. [cited 2023 Dec 18]. Available from: <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10167-1020750025.htm>
23. Cui F, Xi L, Zhao G, Wang D, Tan X, Li J, *et al.* Screening of xanthine oxidase inhibitory peptides by ligand fishing and molecular docking technology. *Food Bioscience*. 2022;50:102152. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102152>
24. Zhong H, Abdullah, Zhang Y, Deng L, Zhao M, Tang J, *et al.* Exploring the potential of novel xanthine oxidase inhibitory peptide (ACECD) derived from Skipjack tuna hydrolysates using affinity-ultrafiltration coupled with HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS. *Food Chemistry*. 2021;347:129068. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129068>
25. Zhang H, Saravanan KM, Zhang JZH, Wu X. Deep-learning based bioactive peptides generation and screening against Xanthine oxidase. *bioRxiv*. 2023;11:523536. <https://doi.org/10.1101/2023.01.11.523536>
26. Hou M, Xiang H, Hu X, Chen Sh, Wu Y, Xu J, *et al.* Novel potential XOD inhibitory peptides derived from *Trachinotus ovatus*: isolation, identification and structure-function analysis. *Food Bioscience*. 2022;47:101639. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101639>
27. Wei L, Hongwu JI, Song W, Peng S, Zhan S, Qu Y, *et al.* Identification and molecular docking of two novel peptides with xanthine oxidase inhibitory activity from *Auxis thazard*. *Food Science and Technology*. 2022;42:e106921. <https://doi.org/10.1590/fst.106921>
28. Chen X, Guan W, Li Y, Zhang J, Cai L. Xanthine oxidase inhibitory peptides from *Larimichthys polyactis*: characterization and *in vitro/in silico* evidence. *Foods*. 2023;2:982. <https://doi.org/10.3390/foods12050982>
29. Zhao Q, Meng Y, Liu J, Hu Z, Du Y, Sun J, *et al.* Separation, identification and docking analysis of xanthine oxidase inhibitory peptides from pacific cod bone-flesh mixture. *LWT*. 2022;167:113862. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113862>
30. Yu Z, Kan R, Wu S, Guo H, Zhao W, Ding L, *et al.* Xanthine oxidase inhibitory peptides derived from tuna protein: virtual screening, inhibitory activity, and molecular mechanisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021; 101(4):1349–1354. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10745>
31. Zhao Q, Jiang X, Mao Zh, Zhang J, Sun J, Mao X. Exploration, sequence optimization and mechanism analysis of novel xanthine oxidase inhibitory peptide from *Ostrea rivularis Gould*. *Food Chemistry*. 2023;404:134537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134537>
32. Mao Zh, Jiang H, Sun J, Mao X. Virtual screening and structure optimization of xanthine oxidase inhibitory peptides from whole protein sequences of Pacific white shrimp *via* molecular docking. *Food Chemistry*. 2023;429:136837. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136837>
33. Liu N, Wang Y, Yang M, Bian W, Zeng L, Yin S, *et al.* A new rice-derived short peptide potentially alleviated hyperuricemia induced by potassium oxonate in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(1):220–228. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05879>
34. Li QY. Study on the structure-activity mechanism of targeting inhibition of xanthine oxidase by uric acid-lowering peptides derived from walnut. [dissertation]. China: South China University of Technology, 2018.
35. Wu Y, He H, Hou T. Purification, identification, and computational analysis of xanthine oxidase inhibitory peptides from kidney bean. *Journal of Food Science*. 2021;86(3):1081–1088. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15603>
36. Dong Y, Sun N, Ge Q, Lv R, Lin S. Antioxidant soy peptide can inhibit xanthine oxidase activity and improve LO2 cell damage. *Food Bioscience*. 2023;52:102455. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102455>
37. Jang I-T, Hyun S-H, Shin J-W, Lee Y-H, Ji J-H, Lee J-S. Characterization of an antigout xanthine oxidase inhibitor from pleurotusostreatus. *Mycobiology*. 2014;42(3):296–300. <https://doi.org/10.5941/myco.2014.42.3.296>
38. Serba EM, Yuraskina TV, Rimareva LV, Tadzibova PYu, Sokolova EN, Volkova GS. Microbial Biomass as a Bioresource of Functional Food Ingredients: A Review. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(3):426–444. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2446>; <https://www.elibrary.ru/OYPVMI>
39. Halavach TM, Kurchenko VP, Tarun EI, Romanovich RV, Mushkevich NV, Kazimirov AD, *et al.* Chitosan complexes with amino acids and whey peptides: Sensory and antioxidant properties. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(1):13–21. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-1-584>; <https://elibrary.ru/XMDORK>
40. Classical and molecular biology [Internet]. [cited 2023 Dec 21]. Available from: <https://molbiol.ru/?&langid=en>
41. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. 1982;157(1):105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)

42. Kumar N, Kaur K, Bedi PMS. Hybridization of molecular docking studies with machine learning based QSAR model for prediction of xanthine oxidase activity. Computational and Theoretical Chemistry. 2023;1227:114262. <https://doi.org/10.1016/J.COMPTC.2023.114262>
43. Thakur A, Kumar A, Sharma V, Mehta V. PIC50: An open source tool for interconversion of PIC50 values and IC50 for efficient data representation and analysis. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18440.70408>
44. Du Z, Ding X, Xu Y, Li Y. UniDL4BioPep: a universal deep learning architecture for binary classification in peptide bioactivity. Briefings in Bioinformatics. 2023;24(3):bbad135. <https://doi.org/10.1093/bib/bbad135>
45. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific Reports. 2017;7:42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
46. Manzoor M, Singh J, Gani A. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: *in vitro*, *in silico* and *in vivo* studies. Food Chemistry. 2021;373:131395. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131395>
47. Nongonierma AB, Mooney C, Shields DC, FitzGerald RJ. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV and xanthine oxidase by amino acids and dipeptides. Food Chemistry. 2013;141(1):644–653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.115>
48. Bellaver EH, Kempka AP. Potential of milk-derived bioactive peptides as antidiabetic, antihypertensive, and xanthine oxidase inhibitors: a comprehensive bibliometric analysis and updated review. Amino Acids. 2023;55:1829–1855. <https://doi.org/10.1007/s00726-023-03351-9>
49. Li Y, Kang X, Li Q, Shi C, Lian Y, Yuan E, et al. Anti-hyperuricemic peptides derived from bonito hydrolysates based on *in vivo* hyperuricemic model and *in vitro* xanthine oxidase inhibitory activity. Peptides. 2018;107:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.001>
50. He W, Su G, Sun-Waterhouse D, Waterhouse GIN, Zhao M, Liu Y. *In vivo* anti-hyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory properties of tuna protein hydrolysates and its isolated fractions. Food Chemistry. 2019;272:453–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.057>
51. Li Q, Shi C, Wang M, Zhou M, Liang M, Zhang T, et al. Tryptophan residue enhances *in vitro* walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities. Journal of Functional Foods. 2019;53:276–285. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.024>
52. Zhao L, Ai X, Pan F, Zhou N, Zhao L, Cai S, et al. Novel peptides with xanthine oxidase inhibitory activity identified from macadamia nuts: integrated *in silico* and *in vitro* analysis. European Food Research and Technology. 2022;248:2031–2042. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04028-5>
53. Xu Y, Gong H, Zou Y, Mao X. Antihyperuricemic activity and inhibition mechanism of xanthine oxidase inhibitory peptides derived from whey protein by virtual screening. Journal Dairy Science. 2023;107(4):1877–1886. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24028>
54. Huang X-N, Zhang Y-M, Wen Y, Jiang Y, Wang C-H. Protease-catalyzed rational synthesis of uric acid-lowering peptides in non-aqueous medium. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2022;28:61. <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10367-4>
55. Allahyari M, Samadi-Noshahr Z, Hosseinian S, Salmani H, Noras M, Khajavi-Rad A. Camel milk and allopurinol attenuated adenine-induced acute renal failure in rats Iranian Journal of Science. 2021;45:1539–1548. <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01155-8>
56. Li Q, Li X, Wang J, Liu H, Kwong JS-W, Chen H, et al. Diagnosis and treatment for hyperuricemia and gout: a systematic review of clinical practice guidelines and consensus statements. BMJ Open. 2019;9:e026677. <http://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026677>
57. Huang Y, Fan S, Lu G, Sun N, Wang R, Lu C, et al. Systematic investigation of the amino acid profiles that are correlated with xanthine oxidase inhibitory activity: Effects, mechanism and applications in protein source screening. Free Radical Biology and Medicine. 2021;177:326–336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.004>
58. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology. 2001;55:165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
59. Shirvani-Rad S, Khatibzade-Nasari N, Ejtahed H-S, Larijani B. Exploring the role of gut microbiota dysbiosis in gout pathogenesis: a systematic review. Frontiers in Medicine. 2023;10:1163778. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1163778>
60. Zheliabina OV, Eliseev MS, Glukhova SI, Nasonov EL. Contributing Factors of Diabetes Mellitus among Patients with Gout (Results of the Long-Term Prospective Study). Doklady Biochemistry and Biophysics. 2023;511(1):195–202. <https://doi.org/10.1134/S1607672923700321>; <https://elibrary.ru/TWNBMB>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2537>  
<https://elibrary.ru/AUPEER>

Original article  
Available online at <https://fppt.ru/en>

## Effects of Coconut Flour and Milk Powder Supplementation on the Physicochemical Properties of Peanut Butter

Momin Khan<sup>1</sup>, Suman Rana<sup>2</sup>, Juwel Rana<sup>3</sup>,  
Entaduzzaman Jony<sup>1</sup>, Shoaib Arifin<sup>3</sup>,  
Fahad Jubayer<sup>4,\*</sup>, Abdul Alim<sup>5,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman Science and Technology University<sup>ROR</sup>, Gopalganj, Bangladesh

<sup>2</sup> Jashore University of Science and Technology<sup>ROR</sup>, Jashore, Bangladesh

<sup>3</sup> Daffodil International University<sup>ROR</sup>, Dhaka, Bangladesh

<sup>4</sup> Sylhet Agricultural University<sup>ROR</sup>, Sylhet, Bangladesh

<sup>5</sup> Bangladesh Agricultural University<sup>ROR</sup>, Mymensingh, Bangladesh

Received: 12.04.2024  
Revised: 07.05.2024  
Accepted: 04.06.2024

\*Fahad Jubayer: [fahadbau21@hotmail.com](mailto:fahadbau21@hotmail.com),  
<https://orcid.org/0000-0003-4914-7284>

\*\*Abdul Alim: [maalim07@yahoo.com](mailto:maalim07@yahoo.com),  
<https://orcid.org/0000-0001-6084-617X>

Momin Khan: <https://orcid.org/0009-0002-4874-6314>

Suman Rana: <https://orcid.org/0000-0002-3346-2274>

Juwel Rana: <https://orcid.org/0000-0003-1451-8882>

Entaduzzaman Jony: <https://orcid.org/0009-0002-6452-0331>

Shoaib Arifin: <https://orcid.org/0000-0003-0922-6228>

© M. Khan, S. Rana, J. Rana, E. Jony, S. Arifin, F. Jubayer, A. Alim, 2024



### Abstract.

Peanut butter is a popular, versatile food spread globally known for its nutritional value and unique flavor. As consumer preferences evolve, there is an increasing demand for fortified products. Coconut flour and milk powder are potential fortification agents due to their nutritional benefits and compatibility with various food matrices.

We explored the effects of incorporating coconut flour and milk powder into peanut butter, analyzing its nutritional composition and sensory qualities. Various combinations (0, 5, 10, and 15% w/w) of coconut flour, milk powder, and their mixture were introduced into peanut butter followed by a thorough physicochemical and sensory analysis.

The results showed notable changes in both physical and chemical attributes. Coconut flour and its combination with milk powder increased the moisture content in peanut butter, while milk powder had the opposite effect. The protein content peaked in the peanut butter with 15% coconut flour, while the fat content diminished with higher concentrations of coconut flour and milk powder. Carbohydrate levels in the supplemented samples surpassed those of the control and commercial peanut butters. All the variants exhibited a pseudoplastic flow behavior, with coconut flour and milk powder concentrations affecting viscosity. The textural analysis revealed differences in oil separation, spreadability, and firmness, with 15% coconut flour yielding the highest firmness and oil separation. Noteworthy color changes were evident, particularly with the inclusion of 15% milk powder. Sensory assessments favored the peanut butter with a 15% blend of coconut flour and milk powder, while the color preference leaned towards the 15% milk powder variant. The consumers preferred the peanut butter fortified with a 15% blend of coconut flour and milk powder.

Our research can help food manufacturers create healthier, more appealing products that cater to evolving consumer preferences and dietary requirements.

**Keywords.** Butter, nuts, milk powder, fortification, rheology, texture, quality, sensory evaluation

**For citation:** Khan M, Rana S, Rana J, Jony E, Arifin MS, Jubayer F, *et al.* Effects of Coconut Flour and Milk Powder Supplementation on the Physicochemical Properties of Peanut Butter. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2024;54(4):701–710. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2537>

## Физико-химические свойства арахисовой пасты с добавлением кокосовой муки и сухого молока



М. Хан<sup>1</sup>, С. Рана<sup>2</sup>, Д. Рана<sup>3</sup>, Э. Джони<sup>1</sup>,  
Ш. Арифин<sup>3</sup>, Ф. Джубайер<sup>4,\*</sup>, А. Алим<sup>5,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Бангабандхуский университет науки и технологий шейха Муджибура Рахмана<sup>ROR</sup>,  
Гопалгандж, Бангладеш

<sup>2</sup> Джашорский университет науки и технологий<sup>ROR</sup>, Джессор, Бангладеш

<sup>3</sup> Международный университет Даффодил<sup>ROR</sup>, Дакка, Бангладеш

<sup>4</sup> Силхетский сельскохозяйственный университет<sup>ROR</sup>, Силхет, Бангладеш

<sup>5</sup> Бангладешский сельскохозяйственный университет<sup>ROR</sup>, Мименсингх, Бангладеш

Поступила в редакцию: 12.04.2024

Принята после рецензирования: 07.05.2024

Принята к публикации: 04.06.2024

\* Ф. Джубайер: fahadbau21@hotmail.com,  
<https://orcid.org/0000-0003-4914-7284>

\*\* А. Алим: maalim07@yahoo.com,  
<https://orcid.org/0000-0001-6084-617X>

М. Хан: <https://orcid.org/0009-0002-4874-6314>

С. Рана: <https://orcid.org/0000-0002-3346-2274>

Д. Рана: <https://orcid.org/0000-0003-1451-8882>

Э. Джони: <https://orcid.org/0009-0002-6452-0331>

Ш. Арифин: <https://orcid.org/0000-0003-0922-6228>

© М. Хан, С. Рана, Д. Рана, Э. Джони, Ш. Арифин, Ф. Джубайер,  
А. Алим, 2024



### Аннотация.

Арахисовая паста известна своей пищевой ценностью и уникальным вкусом. По мере развития потребительских предпочтений растет и спрос на обогащенные продукты. Кокосовая мука и сухое молоко имеют ряд преимуществ в этой области, т. к. хорошо сочетаются с различными пищевыми матрицами. Цель исследования заключалась в изучении влияния кокосовой муки и сухого молока на качество арахисовой пасты: ее питательный состав, органолептические свойства и т. д.

В ходе работы кокосовая мука, сухое молоко и их смеси (0, 5, 10 и 15 % по весу) добавлялись в арахисовую пасту. Физико-химические и органолептические показатели определяли с применением стандартных методов анализа. Полученные данные подвергались статистической обработке.

Результаты показали статистически значимые изменения как физических, так и химических свойств. Кокосовая мука и ее различные комбинации с сухим молоком увеличивали содержание влаги в арахисовой пасте. Влияние сухого молока оказалось прямо противоположным. Содержание белка достигло пика в образцах с 15 % кокосовой муки. При более высоких концентрациях кокосовой муки и сухого молока в образцах снижалось качество жира. Экспериментальные образцы содержали больше углеводов, чем контрольный образец и коммерческие образцы арахисовых масел. Для всех образцов было характерно псевдопластическое течение. Уровень вязкости зависел от концентрации кокосовой муки и сухого молока. Образцы различались по отделению жира, намазываемости и твердости. Самые высокие показатели твердости и отделения жира были зафиксированы в образцах с добавлением 15 % кокосовой муки. Наиболее заметные изменения цвета произошли в образцах с добавлением 15 % сухого молока. Наивысшую органолептическую оценку получил образец арахисовой пасты с 15 % смеси кокосовой муки и сухого молока, однако вариант с 15 % сухого молока имел оптимальные цветовые характеристики.

Применение результатов исследований при производстве обогащенной арахисовой пасты позволило расширить спектр функциональных продуктов, которые соответствуют меняющимся предпочтениям потребителей и современным диетическим требованиям.

**Ключевые слова.** Масло, орехи, сухое молоко, обогащение, реология, текстура, качество, сенсорная оценка

**Для цитирования:** Физико-химические свойства арахисовой пасты с добавлением кокосовой муки и сухого молока / М. Хан [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 701–710. (На англ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2537>

## Introduction

The quest for healthier and more sustainable food products has led to increased interest in the modification of traditional foods to improve their nutritional profile and functional properties. One of the challenges of modern food items is meeting consumers' expectations for both taste and health [1]. Peanut butter, a widely consumed food in various global cultures, is valued for its flavorful profile and substantial protein content. Over time, there have been different adaptations of peanut butter to improve its nutritional advantages and sensory qualities. High in protein and low in calories, peanut butter is a healthy alternative to dairy butter and is commonly used as a bread spread [2]. Although peanut butter is more prevalent in western countries than in Asian countries like India, its consumption is gradually increasing. Peanut butter has a range of advantages, such as aiding in weight loss and offering optimal nutritional value [3]. It is available in ready-to-eat forms and is also used in a range of applications such as breakfast food, savory sauces, and smoothies.

Peanuts (*Arachis hypogaea*) are classified as both a grain legume and an oil crop due to their high oil content. Peanut seeds are a valuable source of protein, lipids, and fatty acids, providing essential nutrients for human diet [4]. Roasted peanut kernels are an excellent source of folate, niacin, and vitamin E, although they are deficient in vitamins A and C, as well as calcium and iron [5]. Peanuts are rich in micronutrients, phytochemicals, tocopherols, and phenolic compounds, and the development of peanut butter can potentially increase the uses of peanuts in healthier, non-animal breakfast snack options [6]. The production of peanut butter involves important stages such as roasting and milling, which impact the product's texture, rheological characteristics, and overall quality [7]. Optimal amalgamation of components, such as nut paste, sugar, vegetable oil, and protein sources, is imperative to guarantee the steadfastness of peanut butter. Coconut flour and milk powder can augment the attributes of peanut butter, including its color, taste, flavor, and texture, thus increasing its attractiveness to customers.

Coconut flour is an excellent source of dietary fiber that may be effectively incorporated into food products to enhance their physical, chemical, and nutritional characteristics [8]. Coconut flour may contribute to the flavor, color, and mouth feel of peanut butter, as well as improve its spread quality. Milk powder also plays a significant role in enhancing the quality of peanut butter, including its color, flavor, taste, and overall acceptability. Peanut products supplemented with milk derivatives or comparable components have exhibited changes in sensory qualities. This implies that milk powder may modify the flavor, texture, and general consumer acceptability of peanut butter [9]. Coconut products, along with milk powder, are well-known for their nutritional advantages. They include a significant amount of dietary fiber, healthy fats, and a variety of essential vitamins

and minerals. In this study, we aimed to fill the gap in existing literature by offering a thorough analysis of how these supplements impact the physicochemical characteristics of peanut butter.

Previous studies have touched upon the functional properties of coconut flour and its effects on the texture and sensory properties of baked and confectionery goods. For instance, a work on coconut flour's influence on dough and cookie texture revealed significant improvements in the product's quality and healthfulness [10]. Similarly, an investigation into the effects of coconut milk, tender coconut, and coconut sugar on ice cream highlighted their potential for improving sensory experiences through natural supplementation [11]. These findings underscore the versatility of coconut-derived ingredients in enhancing food products, providing a strong foundation for their application in peanut butter. However, the application of coconut flour and milk powder in peanut butter poses unique challenges and opportunities. These supplements may significantly alter the physicochemical properties of peanut butter, such as its phase behavior, moisture content, and oil binding capacity. They can affect everything in peanut butter, from its nutritional value to its storage stability and consumer acceptability. Therefore, we sought to systematically investigate these impacts, contributing valuable knowledge to the fields of food science and nutrition.

To sum up, the supplementation of peanut butter with coconut flour and milk powder presents a promising avenue for enhancing the nutritional profile and sensory qualities of this popular food product. By systematically exploring the effects of these supplements on the physicochemical properties of peanut butter, we aimed to provide valuable insights for food scientists, nutritionists, and the food industry at large, potentially paving the way for the development of healthier, more sustainable, and more appealing peanut butter products.

## Study objects and methods

**Preparation of coconut flour.** Coconut flour was prepared according to the method of Ramya and Anitha with a slight modification [12]. Freshly purchased fully-grown coconuts were physically stripped of their shells, had their outer layer removed and the coconut water drained. The white coconut flesh was cleaned, mixed with heated water, and then filtered to extract the milk. The residual moist flour was dried in a cabinet dryer at 60°C for 4 hours. The dried substance was packaged and placed in the refrigerator to avoid the development of rancidity.

**Preparation of peanut butter.** Peanut butter was prepared according to the method described by Mohd. Rozalli *et al.* with few modifications [13]. Peanut butter was made by combining roasted peanuts, sugar, coconut flour, milk powder, and salt in varying amounts. After mixing and homogenizing peanut butter, it was placed in plastic containers and stored at room temperature.

Table 1. Formulations of peanut butter with coconut flour and milk powder

Таблица 1. Рецептуры арахисовой пасты с добавлением кокосовой муки и сухого молока

Sample	Peanut, %	Sugar, %	Coconut flour, %	Milk powder, %	Salt, %
S <sub>1</sub>	94.5	5.0	–	–	0.5
S <sub>2</sub>	89.5	5.0	5.0	–	0.5
S <sub>3</sub>	84.5	5.0	10.0	–	0.5
S <sub>4</sub>	79.5	5.0	15.0	–	0.5
S <sub>5</sub>	89.5	5.0	–	5.0	0.5
S <sub>6</sub>	84.5	5.0	–	10.0	0.5
S <sub>7</sub>	79.5	5.0	–	15.0	0.5
S <sub>8</sub>	89.5	5.0	2.5	2.5	0.5
S <sub>9</sub>	84.5	5.0	5.0	5.0	0.5
S <sub>10</sub>	79.5	5.0	7.5	7.5	0.5

Note: S<sub>1</sub> – Control sample; S<sub>2</sub> – Peanut butter with 5% coconut flour; S<sub>3</sub> – Peanut butter with 10% coconut flour; S<sub>4</sub> – Peanut butter with 15% coconut flour; S<sub>5</sub> – Peanut butter with 5% milk powder; S<sub>6</sub> – Peanut butter with 10% milk powder; S<sub>7</sub> – Peanut butter with 15% milk powder; S<sub>8</sub> – Peanut butter with 5% mixture; S<sub>9</sub> – Peanut butter with 10% mixture; and S<sub>10</sub> – Peanut butter with 15% mixture.

Примечание: S<sub>1</sub> – контрольный образец; S<sub>2</sub> – арахисовая паста с 5 % кокосовой муки; S<sub>3</sub> – арахисовая паста с 10 % кокосовой муки; S<sub>4</sub> – арахисовая паста с 15 % кокосовой муки; S<sub>5</sub> – арахисовая паста с 5 % сухого молока; S<sub>6</sub> – арахисовая паста с 10 % сухого молока; S<sub>7</sub> – арахисовая паста с 15 % сухого молока; S<sub>8</sub> – арахисовая паста с 5 % смеси кокосовой муки и сухого молока; S<sub>9</sub> – арахисовая паста с 10 % смеси кокосовой муки и сухого молока; S<sub>10</sub> – арахисовая паста с 15 % смеси кокосовой муки и сухого молока.

Table 1 shows the formulations of peanut butter with various ratios of coconut flour and milk powder.

The composition of the milk powder is presented in Table 2.

**Proximate composition analysis.** The coconut flour, peanut powder, and peanut butter samples were analyzed for moisture, protein, fat, ash, and carbohydrate contents according to the methods of AOAC and Momin *et al.* [14, 15].

**Viscosity.** Viscosity was measured with a digital rotational viscometer (NDJ-5S) to assess the flow behavior and consistency coefficient of the formulated peanut butter. The power law model was used to represent the viscosity of non-Newtonian fluids. The apparent viscosity was determined as a function of spindle speed using the following formula [16]:

$$\mu_a = K (1/n)^n (4\pi N)^{(n-1)} \quad (1)$$

where  $\mu_a$  is the apparent viscosity, Pa·s; N is the spindle speed, RPS; K is the Consistency coefficient, Pa·sn; n is the Flow behavior index, dimensionless.

The procedure involved connecting the spindle, immersing it in the fluid, and recording dial readings at different speeds. The flow behavior index (n) and consistency coefficient (K) were calculated by analyzing the  $\ln(\mu_a)$  values plotted against  $\ln(4\pi N)$ .

**Physical properties.** The oil separation was observed following the method of Radočaj *et al.* with some modifications [17]. Pre-weighted filter paper (A) was put on top of each sample (B). After 24 hours, filter papers were collected and weighed (C) to measure the separated oil as a percentage.

Table 2. Composition of milk powder

Таблица 2. Химический состав сухого молока

Component/parameter	Amount
Protein, %	27
Milk fat (min), %	28
Lactose, %	38
Minerals, %	6
Moisture (max), %	3
Energy (per 100 g), kJ	2100

$$\text{Oil Separation} = \frac{C - A}{B} \times 100 \quad (2)$$

Spreadability and firmness were measured according to the method of Mohd. Rozalli *et al.* with some modifications [13]. A TA.HD PLUS texture analyzer (Stable Microsystems, Surrey, UK) used a load cell of 5 kg with a conical TTC Spreadability Rig (HDP/SR) attachment (Stable Microsystems, Surrey, UK). The weight and height of the machine were calibrated for 5000 g and 25 mm, respectively. The measurement was carried out at a test speed of 1.0 mm/s and a penetration depth of 25 mm. Each operation was conducted in triplicate. The color of the peanut butter samples was evaluated with a Chroma Meter (CR-400/410, Konica Minolta, Japan). The measurements were taken under illuminants \*C and D65 using the LAB color space. The color system applied  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  values, where  $L^*$  represents lightness (100: white, 0: black),  $a^*$  represents redness (+)/greenness (–), and  $b^*$  indicates blueness (–) or yellowness (+). The tests were conducted in tripli-

cate. The value of  $\Delta E^*$  was calculated using the following equation:

$$\text{Color change } (\Delta E) = (L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2 \quad (3)$$

**Sensory analysis.** All the peanut butter samples were analyzed according to the method of Huq *et al.* [18]. Consumer preference was determined on a 1-to-9-point hedonic scale from “Dislike extremely” to “Like extremely.” Sensory properties such as color, flavor, and overall acceptability were evaluated by 15 semi-trained panelists.

**Statistical analysis.** The collected data on various parameters were statistically analyzed using IBM SPSS Statistics (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). The means for all the treatments were calculated and analysis of variance (ANOVA) for all the parameters was performed by F-test. The significance of difference between the pairs of means was compared by the least significant difference (LSD) test at 5% significance.

## Results and discussion

**Proximate composition of peanut powder and coconut flour.** The proximate composition of peanut powder and coconut flour is shown in Table 3. The moisture, protein, fat, carbohydrate, ash, crude fiber, and dry matter contents for peanut powder were 7.5, 24.6, 45.4, 16.6, 2.4, 3.2, and 92.4%, respectively. These re-

sults are consistent with those previously published by Ayoola *et al.* [19]. Conversely, coconut flour included 4.2% moisture, 14.1% protein, 9.6% fat, 49.9% carbohydrates, 8.6% ash, 13.4% crude fiber, and 95.7% dry matter. The results are consistent with the findings reported by Sujirtha and Mahendran [20].

**Proximate composition of peanut butter.** The peanut butter samples, as well as commercial peanut butter, were examined for their moisture, fat, ash, protein, and total carbohydrate contents (Table 4).

Table 4 shows a progressive increase in the moisture content of peanut butter, the highest value recorded in the sample with 15% coconut flour. This rise in moisture

Table 3. Proximate composition of peanut and coconut flour

Таблица 3. Приблизительный химический состав арахисовой и кокосовой муки

Components, %	Peanut powder	Coconut flour
Moisture content	7.50 ± 0.12	4.20 ± 0.15
Protein	24.60 ± 0.11	14.10 ± 0.10
Fat	45.40 ± 0.24	9.60 ± 0.13
Carbohydrate	16.60 ± 0.10	49.90 ± 0.32
Ash	2.40 ± 0.06	8.60 ± 0.12
Crude fiber	3.20 ± 0.10	13.40 ± 0.10
Dry matter	92.40 ± 0.12	95.70 ± 0.15

Table 4. The effects of milk powder and coconut flour on the chemical composition of peanut butter

Таблица 4. Влияние сухого молока и кокосовой муки на химический состав арахисовой пасты

Sample	Moisture, %	Protein, %	Fat, %	Ash, %	Carbohydrate, %
C <sub>1</sub>	1.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	25.10 ± 0.30 <sup>a</sup>	51.10 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.30 <sup>a</sup>	20.10 ± 0.11 <sup>a</sup>
S <sub>1</sub>	2.30 ± 0.02 <sup>b</sup>	25.50 ± 0.55 <sup>a</sup>	46.30 ± 0.19 <sup>b</sup>	2.60 ± 0.55 <sup>a</sup>	23.20 ± 0.24 <sup>b</sup>
S <sub>2</sub>	2.80 ± 0.01 <sup>c</sup>	26.40 ± 0.47 <sup>a</sup>	45.40 ± 0.11 <sup>c</sup>	2.80 ± 0.47 <sup>a</sup>	23.30 ± 1.68 <sup>b</sup>
S <sub>3</sub>	2.80 ± 0.01 <sup>c</sup>	26.70 ± 0.36 <sup>a</sup>	45.20 ± 0.23 <sup>c</sup>	3.10 ± 0.36 <sup>a</sup>	23.20 ± 1.80 <sup>b</sup>
S <sub>4</sub>	2.90 ± 0.02 <sup>d</sup>	27.40 ± 0.60 <sup>a</sup>	44.40 ± 0.21 <sup>d</sup>	2.80 ± 0.60 <sup>a</sup>	23.40 ± 2.15 <sup>b</sup>
S <sub>5</sub>	2.30 ± 0.01 <sup>c</sup>	26.10 ± 0.32 <sup>b</sup>	45.60 ± 0.26 <sup>c</sup>	3.50 ± 0.26 <sup>a</sup>	23.50 ± 1.84 <sup>b</sup>
S <sub>6</sub>	2.30 ± 0.02 <sup>c</sup>	26.90 ± 0.30 <sup>c</sup>	45.20 ± 0.29 <sup>c</sup>	3.60 ± 0.30 <sup>a</sup>	23.50 ± 2.82 <sup>b</sup>
S <sub>7</sub>	2.20 ± 0.02 <sup>f</sup>	27.60 ± 0.35 <sup>c</sup>	44.20 ± 0.22 <sup>f</sup>	3.90 ± 0.35 <sup>a</sup>	23.50 ± 3.07 <sup>b</sup>
S <sub>8</sub>	2.60 ± 0.01 <sup>g</sup>	25.50 ± 0.31 <sup>d</sup>	46.90 ± 0.07 <sup>g</sup>	2.60 ± 0.18 <sup>b</sup>	22.90 ± 1.09 <sup>b</sup>
S <sub>9</sub>	2.80 ± 0.01 <sup>h</sup>	26.23 ± 0.40 <sup>c</sup>	47.30 ± 0.18 <sup>h</sup>	2.80 ± 0.40 <sup>b</sup>	22.10 ± 2.29 <sup>b</sup>
S <sub>10</sub>	3.10 ± 0.01 <sup>i</sup>	26.80 ± 0.32 <sup>c</sup>	47.90 ± 0.04 <sup>i</sup>	2.90 ± 0.32 <sup>b</sup>	21.60 ± 3.13 <sup>b</sup>

Note: Values are expressed as mean ± standard deviation of three replicates. Values with the same superscript within column indicates no significant difference ( $p > 0.05$ ). C<sub>1</sub> – Commercial sample; S<sub>1</sub> – Control sample; S<sub>2</sub> – Peanut butter with 5% coconut flour; S<sub>3</sub> – Peanut butter with 10% coconut flour; S<sub>4</sub> – Peanut butter with 15% coconut flour; S<sub>5</sub> – Peanut butter with 5% milk powder; S<sub>6</sub> – Peanut butter with 10% milk powder; S<sub>7</sub> – Peanut butter with 15% milk powder; S<sub>8</sub> – Peanut butter with 5% mixture; S<sub>9</sub> – Peanut butter with 10% mixture; and S<sub>10</sub> – Peanut butter with 15% mixture.

Примечание: Все значения представлены как среднее значение трех повторных экспериментов ± стандартное отклонение. Данные с одинаковым верхним индексом в одном столбце существенно не различаются ( $p > 0,05$ ).

C<sub>1</sub> – коммерческий образец; S<sub>1</sub> – контрольный образец; S<sub>2</sub> – арахисовая паста с 5 % кокосовой муки; S<sub>3</sub> – арахисовая паста с 10 % кокосовой муки; S<sub>4</sub> – арахисовая паста с 15 % кокосовой муки; S<sub>5</sub> – арахисовая паста с 5 % сухого молока; S<sub>6</sub> – арахисовая паста с 10 % сухого молока; S<sub>7</sub> – арахисовая паста с 15 % сухого молока; S<sub>8</sub> – арахисовая паста с 5 % смеси кокосовой муки и сухого молока; S<sub>9</sub> – арахисовая паста с 10 % смеси кокосовой муки и сухого молока; S<sub>10</sub> – арахисовая паста с 15 % смеси кокосовой муки и сухого молока.

can be ascribed to the elevated protein content, which augments the water retention ability of peanut butter with substantial amounts of coconut flour. The moisture content of peanut butter exhibited a progressive drop from 2.3 to 2.2% when the amount of milk powder added increased from 5 to 15%. The combination of coconut flour and milk powder in the peanut butter lead to a progressive increase in moisture. The moisture content in the commercial peanut butter ( $C_1$ ) was 1.3%, which was lower than that in the control sample (2.3%).

As can be seen in Table 4, incorporating coconut flour into peanut butter (0 to 15%) enhanced the protein content from 25.1 to 26.7%, with the lysine content also increasing, thereby improving its nutritional profile. Adding milk powder (5 to 15%) to peanut butter incrementally raised the protein level from 26.1 to 27.6%. A mixture of coconut flour and milk powder in peanut butter yielded a protein content between 25.5 and 26.8%, similar to the control and commercial samples.

The fat content in peanut butter decreased as the substitution level of coconut flour increased, ranging from 46.3 to 44.4%. Similarly, the partial substitution of milk powder decreased the fat content in peanut butter from 45.6 to 44.2%. However, the mixture of milk powder and coconut flour added to peanut butter increased its fat content from 46.9 to 47.9%. According to our analysis, the commercial peanut butter ( $C_1$ ) had the highest fat content at 51.1%, while the sample with 15% milk powder ( $S_7$ ) had the lowest fat content at 44.2%.

The ash content, indicative of mineral content, increased from 2.6 to 2.8% with coconut flour additions and from 3.5 to 3.9% with milk powder supplementation. This upward trend may be attributed to a higher mineral content in coconut flour compared to peanut. The combination of coconut flour and milk powder raised the ash content from 2.6 to 2.9%. The commercial peanut butter ( $C_1$ ) had the lowest ash content at 2.5%, while the sample with 15% milk powder ( $S_7$ ) had the highest ash content at 3.9%. The control sample had an ash content of 2.5%.

The carbohydrate content varied with ingredient adjustments, increasing from 23.2 to 23.4% with coconut flour supplementation and rising slightly in the samples with milk powder. However, the combination of coconut flour and milk powder led to a decrease in total carbohydrates. The peanut butter with 15% milk powder had the highest carbohydrate content at 23.5%, whereas the commercial sample had the lowest at 20.1%. These results align with the research conducted by Mazaheri-Tehrani *et al.* on peanut butter fortified with soy-flour, Özcan and Seven on peanut varieties from seven cultivars, and Yeh *et al.* on peanut spread fortified with protein, vitamins, and minerals [21–23].

**Physical analysis. Flow behavior.** We investigated the flow behavior of the developed and commercial peanut butter samples, focusing on the effects of coconut flour and milk powder supplementation (Table 5).

Pseudoplasticity character was observed in all samples. Statistical analysis revealed significant differences ( $p < 0.05$ ) in the flow-behavior index ( $n$ ) and consistency coefficient ( $K$ ) between treatments, control, and commercial samples. The control peanut butter had an  $n$  value of 0.11, while the commercial sample had an  $n$  value of 0.06. The increasing addition of coconut flour resulted in a rise in the flow-behavior index ( $n$ ), indicating an increase in the pseudoplasticity of the peanut butter formulation. In contrast, the inclusion of milk powder resulted in a gradual reduction in the flow-behavior index, indicating a drop in pseudoplasticity. The inclusion of milk powder resulted in enhanced sensory qualities, as shown by

Table 5. The effects of coconut flour and milk powder supplementation on the flow behavior of peanut butter

Таблица 5. Влияние кокосовой муки и сухого молока на свойства текучести арахисовой пасты

Sample	Flow behavior index ( $n$ )	Consistency coefficient ( $K$ ), Pa·s <sup>n</sup>
$C_1$	0.06 <sup>f</sup>	112.93 <sup>a</sup>
$S_1$	0.11 <sup>c</sup>	101.33 <sup>c</sup>
$S_2$	0.17 <sup>c</sup>	88.88 <sup>c</sup>
$S_3$	0.19 <sup>b</sup>	83.78 <sup>f</sup>
$S_4$	0.24 <sup>a</sup>	77.43 <sup>g</sup>
$S_5$	0.13 <sup>d</sup>	98.35 <sup>cd</sup>
$S_6$	0.11 <sup>c</sup>	103.85 <sup>c</sup>
$S_7$	0.10 <sup>c</sup>	108.92 <sup>b</sup>
$S_8$	0.14 <sup>d</sup>	96.49 <sup>d</sup>
$S_9$	0.16 <sup>c</sup>	90.40 <sup>c</sup>
$S_{10}$	0.19 <sup>b</sup>	81.86 <sup>f</sup>

Note: The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. The values with the same superscript within a column have no significant difference ( $p > 0.05$ ). The same letters within the column for the behavior index and consistency coefficient indicate no significant difference ( $p < 0.05$ ).

$C_1$  – Commercial sample;  $S_1$  – Control sample;  $S_2$  – Peanut butter with 5% coconut flour;  $S_3$  – Peanut butter with 10% coconut flour;  $S_4$  – Peanut butter with 15% coconut flour;  $S_5$  – Peanut butter with 5% milk powder;  $S_6$  – Peanut butter with 10% milk powder;  $S_7$  – Peanut butter with 15% milk powder;  $S_8$  – Peanut butter with 5% mixture;  $S_9$  – Peanut butter with 10% mixture; and  $S_{10}$  – Peanut butter with 15% mixture.

Примечание: Все значения представлены как среднее значение трех повторных экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение. Данные с одинаковым верхним индексом в одном столбце существенно не различаются ( $p > 0,05$ ). Совпадение букв в столбце для индекса текучести и коэффициента согласованности указывают на отсутствие существенной разницы ( $p < 0,05$ ).

$C_1$  – коммерческий образец;  $S_1$  – контрольный образец;  $S_2$  – арахисовая паста с 5 % кокосовой муки;  $S_3$  – арахисовая паста с 10 % кокосовой муки;  $S_4$  – арахисовая паста с 15 % кокосовой муки;  $S_5$  – арахисовая паста с 5 % сухого молока;  $S_6$  – арахисовая паста с 10 % сухого молока;  $S_7$  – арахисовая паста с 15 % сухого молока;  $S_8$  – арахисовая паста с 5 % смеси кокосовой муки и сухого молока;  $S_9$  – арахисовая паста с 10 % смеси кокосовой муки и сухого молока;  $S_{10}$  – арахисовая паста с 15 % смеси кокосовой муки и сухого молока.

sensory evaluations. When a mixture of coconut flour and milk powder was incorporated, the flow behavior index values resembled those of the control sample. The consistency coefficient (K) ranged from 77.4 to 108.9 Pa·sn for the formulated peanut butters, compared to 101.3 Pa·sn for the control sample and 112.9 Pa·sn for the commercial sample. Addition of coconut flour decreased the consistency coefficient, while addition of milk powder increased it. The combination of coconut flour and milk powder resulted in gradually increasing consistency coefficients with incremental additions of the mixture. The data indicate that coconut flour intensifies pseudoplasticity, improving its propensity to spread, whereas milk powder reduces pseudoplasticity, which may affect sensory characteristics. Coconut flour and milk powder can be combined in an optimum manner to obtain the appropriate flow behavior and consistency in peanut butter compositions.

**Texture and color.** All the peanut butter samples were evaluated for their textural properties (oil separation, spreadability, and firmness), as well as color (Table 6).

As can be seen, the samples supplemented with coconut flour (5 to 15%) exhibited a significant increase in oil separation, from 2.1 to 2.3%. Conversely, the use of milk powder lessened the rate of oil separation. Adding a mixture of coconut and milk powder decreased oil separation (Table 6). The results demonstrate that milk powder has a superior ability to retain oil compared to

coconut flour. Aryana *et al.* supplemented peanut butter with 0, 1.5, 2, and 2.5% palm oil and found oil separation at 4.95, 4.86, 3.98, and 5.51%, respectively [24]. The separated oil gets rancid and deteriorates the quality of peanut butter. Our findings are consistent with those reported by Ferdaus *et al.*, who assessed natural waxes as stabilizers for peanut butter, and those reported by Winkler-Moser *et al.*, who evaluated beeswax, candelilla wax, rice bran wax, and sunflower wax as alternative stabilizers for peanut butter [25, 26].

According to Table 6, the use of coconut powder (5 to 15%) resulted in increased spreadability and firmness of peanut butter. The addition of milk powder resulted in contrasting changes in spreadability and stiffness. The combination of coconut flour and milk powder improved the spreadability and firmness of the samples, with an increase ranging from 7.3 to 7.4% and from 13.7 to 13.9%, respectively. The spreadability of the experimental samples was greater than that of the control sample and the commercial peanut butter. These results align with the findings of Ferdaus *et al.* in their evaluation of natural waxes as stabilizers for peanut butter, as well as with the research conducted by Mohd. Rozalli *et al.* on the quality variations of stabilizer-free natural peanut butter during storage [13, 25].

Finally, there was a noticeable variation in color across the different samples. The  $\Delta E$  color parameter was assessed in relation to the commercial peanut butter. The

Table 6. Textural properties of peanut butter

Таблица 6. Текстуальные свойства арахисовой пасты

Sample	Oil separation, %	Spreadability, NS <sup>-1</sup>	Firmness, N	Color $\Delta E$
C <sub>1</sub>	1.90 ± 0.13 <sup>b</sup>	7.10 ± 0.46 <sup>bc</sup>	12.90 ± 0.33 <sup>bc</sup>	–
S <sub>1</sub>	2.10 ± 0.17 <sup>ab</sup>	7.20 ± 0.34 <sup>bc</sup>	13.60 ± 0.62 <sup>bc</sup>	2.70 ± 0.23 <sup>f</sup>
S <sub>2</sub>	2.10 ± 0.22 <sup>ab</sup>	7.50 ± 0.13 <sup>ab</sup>	13.90 ± 0.95 <sup>b</sup>	4.30 ± 0.27 <sup>cd</sup>
S <sub>3</sub>	2.20 ± 0.16 <sup>ab</sup>	7.70 ± 1.12 <sup>ab</sup>	14.40 ± 1.21 <sup>ab</sup>	5.80 ± 0.42 <sup>c</sup>
S <sub>4</sub>	2.30 ± 0.25 <sup>a</sup>	7.90 ± 0.13 <sup>a</sup>	14.80 ± 0.71 <sup>a</sup>	7.50 ± 0.61 <sup>b</sup>
S <sub>5</sub>	2.10 ± 0.17 <sup>ab</sup>	7.10 ± 0.78 <sup>bc</sup>	13.60 ± 0.62 <sup>bc</sup>	4.50 ± 0.85 <sup>d</sup>
S <sub>6</sub>	2.10 ± 0.13 <sup>ab</sup>	7.10 ± 0.12 <sup>bc</sup>	13.10 ± 0.33 <sup>c</sup>	7.40 ± 1.12 <sup>bc</sup>
S <sub>7</sub>	2.10 ± 0.37 <sup>b</sup>	6.80 ± 0.46 <sup>c</sup>	12.90 ± 1.21 <sup>c</sup>	10.90 ± 0.85 <sup>a</sup>
S <sub>8</sub>	2.10 ± 0.22 <sup>ab</sup>	7.30 ± 0.53 <sup>b</sup>	13.70 ± 0.95 <sup>bc</sup>	3.20 ± 0.61 <sup>c</sup>
S <sub>9</sub>	2.10 ± 0.37 <sup>ab</sup>	7.40 ± 0.34 <sup>ab</sup>	13.70 ± 0.71 <sup>bc</sup>	5.20 ± 0.23 <sup>bc</sup>
S <sub>10</sub>	2.10 ± 0.09 <sup>ab</sup>	7.40 ± 0.78 <sup>ab</sup>	13.90 ± 0.62 <sup>bc</sup>	7.20 ± 0.42 <sup>bc</sup>

Note: The values are expressed as mean ± standard deviation of three replicates. The values with the same superscript within a column have no significant difference ( $p > 0.05$ ). C<sub>1</sub> – Commercial sample; S<sub>1</sub> – Control sample; S<sub>2</sub> – Peanut butter with 5% coconut flour; S<sub>3</sub> – Peanut butter with 10% coconut flour; S<sub>4</sub> – Peanut butter with 15% coconut flour; S<sub>5</sub> – Peanut butter with 5% milk powder; S<sub>6</sub> – Peanut butter with 10% milk powder; S<sub>7</sub> – Peanut butter with 15% milk powder; S<sub>8</sub> – Peanut butter with 5% mixture; S<sub>9</sub> – Peanut butter with 10% mixture; and S<sub>10</sub> – Peanut butter with 15% mixture.

Примечание: Все значения представлены как среднее значение трех повторных экспериментов ± стандартное отклонение. Данные с одинаковым верхним индексом в одном столбце существенно не различаются ( $p > 0,05$ ).

C<sub>1</sub> – коммерческий образец; S<sub>1</sub> – контрольный образец; S<sub>2</sub> – арахисовая паста с 5 % кокосовой муки; S<sub>3</sub> – арахисовая паста с 10 % кокосовой муки; S<sub>4</sub> – арахисовая паста с 15 % кокосовой муки; S<sub>5</sub> – арахисовая паста с 5 % сухого молока; S<sub>6</sub> – арахисовая паста с 10 % сухого молока; S<sub>7</sub> – арахисовая паста с 15 % сухого молока; S<sub>8</sub> – арахисовая паста с 5 % смеси кокосовой муки и сухого молока; S<sub>9</sub> – арахисовая паста с 10 % смеси кокосовой муки и сухого молока; S<sub>10</sub> – арахисовая паста с 15 % смеси кокосовой муки и сухого молока.

control sample ( $S_1$ ) had a significantly lower  $\Delta E$  value of 2.75, which increased as more coconut powder was added. Comparable patterns were observed for peanut butter that was enhanced with milk powder, as well as with a combination of coconut flour and milk powder. The increased  $\Delta E$  signifies a greater degree of color variation against the reference, indicating changes in sensory properties. Larger quantities of coconut flour and milk powder in the samples enhanced both their lightness and whiteness. Conversely, smaller amounts of these supplements reduced the lightness and whiteness parameters. These findings emphasize the capacity of these components to improve the visual characteristics of peanut butter.

**Sensory properties.** The peanut butter samples showed significant differences in color (Table 7). Sample  $S_{10}$  had the highest mean score of 8.0, suggesting that it was ‘liked very much’. There were no significant color differences among samples  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$ ,  $S_6$ ,  $S_8$ ,  $S_9$ , and  $S_{10}$ , with the scores ranging from 6.8 to 7.5 (‘like moderately’). The control ( $S_1$ ), commercial sample ( $C_1$ ), and sample  $S_2$  (5% coconut flour) earned the lowest scores of 6.6, 6.0, and 6.9, respectively, suggesting that they were ‘liked slightly’.

Regarding flavor preference, significant differences were observed among the samples ( $p < 0.05$ ). Sample  $S_{10}$  obtained the highest mean score of 8.0 (‘like very much’). No significant differences in flavor were found among samples  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_5$ ,  $S_7$ ,  $S_6$  and  $S_9$ , with the scores ranging from 6.4 to 7.6 (‘like moderately’). The commercial sample ( $C_1$ ) obtained the lowest score of 5.7 (‘like slightly’). Sample  $S_{10}$  (15% mixture) achieved the highest mean score of 8.0 (‘like very much’).

No significant differences in overall acceptability were found among samples  $S_5$ ,  $S_6$ ,  $S_7$ ,  $S_8$  and  $S_9$ , with the scores ranging from 6.7 to 7.5 (‘like moderately’). Samples  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ , and  $S_4$  obtained scores of 6.3, 6.4, 6.5, and 6.4, respectively (‘like slightly’). The commercial sample ( $C_1$ ) was given the lowest score of 5.6 (‘neither like nor dislike’).

## Conclusion

We analyzed the chemical compositions of peanuts and coconut flour, as well as the variations of peanut butter developed using these ingredients. In particular, we determined their moisture, protein, fat, carbohydrate, ash, and crude fiber contents. According to the results, the addition of coconut flour increased the moisture content in peanut butter, while the addition of milk powder decreased it. The protein content increased in the samples with a mixture of coconut flour and milk powder. The fat content decreased with increasing coconut flour supplementation but was unaffected by the mixture of coconut flour and milk powder. The carbohydrate content increased in all the treatments. The ash content increased in the peanut butter supplemented with coconut flour and a combination of coconut flour and milk powder. The

Table 7. Sensory evaluation of peanut butter samples

Таблица 7. Органолептическая оценка образцов арахисовой пасты

Sample	Flavor	Color	Taste	Overall acceptability
$C_1$	5.7 <sup>d</sup>	6.0 <sup>c</sup>	5.6 <sup>d</sup>	5.6 <sup>d</sup>
$S_1$	6.9 <sup>bc</sup>	6.6 <sup>bc</sup>	7.2 <sup>bc</sup>	6.3 <sup>cd</sup>
$S_2$	6.9 <sup>bc</sup>	6.9 <sup>bc</sup>	6.4 <sup>cd</sup>	6.5 <sup>c</sup>
$S_3$	7.2 <sup>abc</sup>	7.1 <sup>ab</sup>	7.3 <sup>abc</sup>	6.6 <sup>c</sup>
$S_4$	7.2 <sup>abc</sup>	7.2 <sup>ab</sup>	7.2 <sup>abc</sup>	6.4 <sup>cd</sup>
$S_5$	6.4 <sup>cd</sup>	7.3 <sup>ab</sup>	7.7 <sup>abc</sup>	6.7 <sup>bc</sup>
$S_6$	6.8 <sup>bc</sup>	7.5 <sup>ab</sup>	6.9 <sup>abc</sup>	6.7 <sup>bc</sup>
$S_7$	7.2 <sup>abc</sup>	8.0 <sup>a</sup>	7.6 <sup>ab</sup>	7.0 <sup>bc</sup>
$S_8$	7.3 <sup>ab</sup>	6.8 <sup>bc</sup>	7 <sup>abc</sup>	7.5 <sup>ab</sup>
$S_9$	7.6 <sup>ab</sup>	7.1 <sup>ab</sup>	7 <sup>abc</sup>	7.1 <sup>bc</sup>
$S_{10}$	8.0 <sup>a</sup>	7.1 <sup>ab</sup>	8.0 <sup>a</sup>	8.0 <sup>a</sup>
LSD	0.42	0.46	0.51	0.41

Note: The values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. The values with the same superscript within a column have no significant difference ( $p > 0.05$ ).

$C_1$  – Commercial sample;  $S_1$  – Control sample;  $S_2$  – Peanut butter with 5% coconut flour;  $S_3$  – Peanut butter with 10% coconut flour;  $S_4$  – Peanut butter with 15% coconut flour;  $S_5$  – Peanut butter with 5% milk powder;  $S_6$  – Peanut butter with 10% milk powder;  $S_7$  – Peanut butter with 15% milk powder;  $S_8$  – Peanut butter with 5% mixture;  $S_9$  – Peanut butter with 10% mixture; and  $S_{10}$  – Peanut butter with 15% mixture.

Примечание: Все значения представлены как среднее значение трех повторных экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение. Данные с одинаковым верхним индексом в одном столбце существенно не различаются ( $p > 0,05$ ).

$C_1$  – коммерческий образец;  $S_1$  – контрольный образец;  $S_2$  – арахисовая паста с 5 % кокосовой муки;  $S_3$  – арахисовая паста с 10 % кокосовой муки;  $S_4$  – арахисовая паста с 15 % кокосовой муки;  $S_5$  – арахисовая паста с 5 % сухого молока;  $S_6$  – арахисовая паста с 10 % сухого молока;  $S_7$  – арахисовая паста с 15 % сухого молока;  $S_8$  – арахисовая паста с 5 % смеси кокосовой муки и сухого молока;  $S_9$  – арахисовая паста с 10 % смеси кокосовой муки и сухого молока;  $S_{10}$  – арахисовая паста с 15 % смеси кокосовой муки и сухого молока.

sample with 15% mixture was the most highly acceptable, while the sample with 15% milk powder had the highest color preference score. The developed peanut butter variations had superior color, flavor, and taste compared to the commercial and control samples. Through systematic experimentation and analysis, our study provides valuable insights into the formulation of fortified peanut butter with improved nutritional quality and sensory appeal. Such knowledge can empower food manufacturers to develop healthier and more appealing products that cater to evolving consumer preferences and dietary requirements.

## Ethics statement

The sensory evaluation was carried out in compliance with the established ethical rules. Each panelist was

required to give an informed written consent before proceeding with the process. Noteworthy, there are no strict requirements in Bangladesh for obtaining ethical approval for sensory tests [27].

#### Contribution

All authors have contributed equally to the study and are equally responsible for the information published in this article.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding this publication.

#### Acknowledgement

The authors thank the Department of Food Technology and Rural Industries, Bangladesh Agricultural University for providing its lab facilities.

#### Заявление об этике

Процедура органолептической оценки проведена в соответствии с установленными этическими прави-

лами, а также предусматривала предоставление информированного письменного согласия от каждого участника. В Бангладеш для проведения органолептической оценки не требуется одобрения комитета по этике [27].

#### Критерии авторства

Все авторы внесли равный вклад в исследование и несут равную ответственность за информацию, опубликованную в данной статье.

#### Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциальных конфликтов интересов в отношении исследования, авторства и / или публикации данной статьи.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность кафедре пищевых технологий и сельскохозяйственной промышленности Бангладешского сельскохозяйственного университета за предоставление лабораторного оборудования.

### References

1. Pchelkina VA, Chernukha IM, Nikitina MA, Ilin NA. Pig adipose tissue of two different breeds and locations: morphology and Raman studies. *Foods and Raw Materials*. 2023;11(1):1–9. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-547>; <https://www.elibrary.ru/RGPVXQ>
2. Alasalvar C, Shahidi F. *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*. Boca Raton: CRC Press; 2008. 340 p. <https://doi.org/10.1201/9781420019391>
3. Suchoszek-Łukaniuk K, Jaromin A, Korycińska M, Kozubek A. Health benefits of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds and peanut oil consumption. In: Preedy VR, Watson RR, Patel VB, editors. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Academic Press; 2011. pp.873–880. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10103-3>
4. Arya SS, Salve AR, Chauhan S. Peanuts as functional food: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2016;53(2):31–41. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2007-9>
5. Toomer OT. Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea*). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(17):3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1339015>
6. Çiftçi S, Suna G. Functional components of peanuts (*Arachis Hypogaea* L.) and health benefits: A review. *Future Foods*. 2022;5:100140. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100140>
7. Sithole TR, Ma Y-X, Qin Z, Liu H-M, Wang X-D. Technical aspects of peanut butter production processes: Roasting and grinding processes review. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022;46(4):e16430. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16430>
8. Jiamjariyatam R, Roskhrua P, Attiwittayaporn S. Effect of Coconut Flour on Biscuit Quality. *Journal of Culinary Science and Technology*. 2022;20(3):278–292. <https://doi.org/10.1080/15428052.2021.1978362>
9. Elsmania MO, Ahmedb IAM. Physicochemical Characteristics and Organoleptic Properties of Peanuts Milk-Based Yoghurt Fortified with Skimmed Milk Powder. *Journal of Research in Applied sciences*. 2014;1(4):68–72.
10. Dat LQ, Phuong VTH. Functional properties and influences of coconut flour on texture of dough and cookies. *Vietnam Journal of Science and Technology*. 2017;55(5A):100–107.
11. Beegum PPS, Nair JP, Manikantan MR, Pandiselvam R, Shill S, Neenu S, et al. Effect of coconut milk, tender coconut and coconut sugar on the physico-chemical and sensory attributes in ice cream. *Journal of Food Science and Technology*. 2022;59(7):2605–2616. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05279-y>
12. Ramya HN, Anitha S. Development of Muffins from Wheat Flour and Coconut Flour using Honey as a Sweetener. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2020;9(7):2231–2240. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2020.907.260>
13. Mohd Rozalli NH, Chin NL, Yusof YA, Mahyudin N. Quality changes of stabilizer-free natural peanut butter during storage. *Journal of Food Science and Technology*. 2016;53(1):694–702. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2006-x>

14. Official methods of analysis. 18th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists; 2010.
15. Momin MA, Jubayer MF, Begum AA, Nupur AH, Ranganathan TV, Mazumder MAR. Substituting wheat flour with okara flour in biscuit production. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(2):422–428. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-422-428>
16. Rizvi SSH, Mittal GS. *Experimental methods in Food Engineering*. New Delhi: CBS Publisher and Distributor; 1997. 289 p.
17. Radočaj O, Dimić E, Vujasinović V. Development of a Hull-Less Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil Press-Cake Spread. *Journal of Food Science*. 2012;77(9):1011–1017. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02874>
18. Huq S, Das PC, Islam A, Jubayer F, Ranganathan TV, Mazumder AR. Nutritional, textural, and sensory quality of oil fried donut enriched with extracted dietary fiber and okara flour. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021;45(3):e15310. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15310>
19. Ayoola PB, Adeyeye A, Onawumi OO. Chemical evaluation of food value of groundnut (*Arachi hypogaea*) seeds. *American Journal of Food and Nutrition*. 2012;2(3):55–57. <https://doi.org/10.5251/ajfn.2012.2.3.55.57>
20. Sujirtha N, Mahendran T. Use of Defatted Coconut Flour as a Source of Protein and Dietary Fiber in Wheat Biscuits. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 2015;4(8):7344–7352.
21. Mazaheri-Tehrani M, Yeganehzad S, Razmkhah-sharabiani S, Amjadi H. Physicochemical and Sensory Properties of Peanut Spreads Fortified with Soy Flour. *World Applied Sciences Journal*. 2009;7(2):192–196.
22. Özcan M, Seven S. Physical and chemical analysis and fatty acid composition of peanut, peanut oil and peanut butter from ÇOM and NC-7 cultivars. *Grasas y Aceites*. 2003;54(1):12–18. <https://doi.org/10.3989/GYA.2003.V54.I1.270>
23. Yeh JY, Resurreccion AVA, Phillips RD, Hung YC. Overall Acceptability and Sensory Profiles of Peanut Spreads Fortified with Protein, Vitamins, and Minerals. *Journal of Food Science*. 2002;65(7):1979–1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08756.x>
24. Aryana KJ, Resurreccion AVA, Chinnan MS, Beuchat LR. Functionality of Palm Oil as a Stabilizer in Peanut Butter. *Journal of Food Science*. 2003;68(4):1301–1307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09643.x>
25. Ferdous MJ, Blount RJS, Silva RC. Assessment of Natural Waxes as Stabilizers in Peanut Butter. *Foods*. 2022;11(19):3127. <https://doi.org/10.3390/foods11193127>
26. Winkler-Moser JK, Anderson J, Byars JA, Singh M, Hwang HS. Evaluation of beeswax, candelilla wax, rice bran wax, and sunflower wax as alternative stabilizers for peanut butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2019;96(11):1235–1248. <https://doi.org/10.1002/aocs.12276>
27. Zinia SA, Nupur AH, Karmoker P, Hossain A, Jubayer MF, Akhter D, et al. Effects of sprouting of soybean on the anti-nutritional, nutritional, textural and sensory quality of tofu. *Heliyon*. 2022;8(10):e10878. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10878>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2538>  
<https://elibrary.ru/IKTVVR>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Влияние молочных компонентов на реологические свойства пшеничного теста и оценка его пригодности для 3D-печати



А. Н. Мартеха<sup>1,\*</sup>, В. В. Торопцев<sup>1</sup>,  
Ю. Е. Каверина<sup>1</sup>, И. А. Короткий<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный аграрный университет –  
Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева<sup>ROR</sup>, Москва, Россия

<sup>2</sup> Кемеровский государственный университет<sup>ROR</sup>, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 30.01.2024  
Принята после рецензирования: 23.04.2024  
Принята к публикации: 07.05.2024

\*А. Н. Мартеха: [man6630@rgau-msha.ru](mailto:man6630@rgau-msha.ru),  
<https://orcid.org/0000-0002-7380-0477>  
В. В. Торопцев: <https://orcid.org/0000-0001-6448-5586>  
Ю. Е. Каверина: <https://orcid.org/0000-0002-8352-922X>  
И. А. Короткий: <https://orcid.org/0000-0002-7623-0940>

© А. Н. Мартеха, В. В. Торопцев, Ю. Е. Каверина,  
И. А. Короткий, 2024



### Аннотация.

Пшеничное тесто используется в качестве основы или связующего вещества при приготовлении многих продуктов питания и является одним из наиболее перспективных материалов для создания инновационных пищевых продуктов с использованием 3D-печати. Целью данной работы являлось изучение влияния молочных ингредиентов на реологические характеристики теста из пшеничной муки и оценка его пригодности к экструзионной трехмерной печати.

Рецептура теста для проведения исследований предполагала смешивание пшеничной муки с водой при определенном гидромодуле и добавлении молочных компонентов, таких как сухое молоко, сывороточный белок, обезжиренный йогурт. Определение реологических свойств осуществляли методом обратной экструзии в анализаторе текстуры и на ротационном вискозиметре.

Пшеничное тесто с влажностью 65 % и содержанием (по массе) одного из компонентов – 5 % сухого молока, 0–2,5 % изолята сывороточного белка или 20 % йогурта – имело значения реологических характеристик, находящихся в определенных диапазонах: комплексной вязкости – 1900–2100 Па·с, тангенса угла механических потерь – 0,14–0,16 и силы сопротивления – 20,0–23,5 Н. Полученные значения были близки к оптимальным показателям реологических характеристик контрольного образца пшеничного теста, пригодного для 3D-печати.

Результаты исследований могут быть использованы при разработке составов мучных изделий, предназначенных для изготовления методом экструзионной 3D-печати. В дальнейшем планируется проведение экспериментов по 3D-печати пшеничного теста с добавлением молочных ингредиентов, а также определение оптимальных кинематических и геометрических параметров процесса экструзионной 3D-печати.

**Ключевые слова.** Тесто, 3D-печать, экструзия, реология, пшеничная мука, молочные ингредиенты

**Для цитирования:** Влияние молочных компонентов на реологические свойства пшеничного теста и оценка его пригодности для 3D-печати / А. Н. Мартеха [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 711–721. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2538>

## The Influence of Dairy Components on the Rheological Properties of Wheat Dough and Assessment of its Suitability for 3D Printing



Alexander N. Martekha<sup>1,\*</sup>, Vasiliy V. Toroptsev<sup>1</sup>,  
Yuliya E. Kaverina<sup>1</sup>, Igor A. Korotkiy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Russian State Agrarian University Moscow Timiryazev Agricultural Academy<sup>ROR</sup>, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Kemerovo State University<sup>ROR</sup>, Kemerovo, Russia

Received: 30.01.2024

Revised: 23.04.2024

Accepted: 07.05.2024

\*Alexander N. Martekha: [man6630@rgau-msha.ru](mailto:man6630@rgau-msha.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-7380-0477>

Vasiliy V. Toroptsev: <https://orcid.org/0000-0001-6448-5586>

Yuliya E. Kaverina: <https://orcid.org/0000-0002-8352-922X>

Igor A. Korotkiy: <https://orcid.org/0000-0002-7623-0940>

© A.N. Martekha, V.V. Toroptsev, Y.E. Kaverina, I.A. Korotkiy, 2024



### Abstract.

Wheat dough is a popular binder in many food formulations. It is also the most promising material for 3D-printed innovative food products. The article describes the effect of dairy ingredients on the rheological profile of wheat dough and its prospects for extrusion 3D printing.

The test samples involved flour mixed with different amounts of water and various dairy components, e.g., milk powder, whey protein, and low-fat yogurt. The rheological properties were tested using the reverse extrusion method in a texture analyzer and a spindle viscometer.

The best wheat dough sample had 65% moisture content, 5% milk powder (by weight), and 0–2.5% whey protein isolate or 20% yogurt. The sample demonstrated the optimal rheological properties that were close to those of the control sample: 1900–2100 Pa·s complex viscosity, 0.14–0.16 mechanical loss tangent, and 20–23.5 N resistance.

The results can be used to develop innovative 3D-printed flour products. Further research will involve experiments in 3D printing of wheat dough with various dairy ingredients to determine the optimal kinematic and geometric parameters for extrusion 3D printing.

**Keywords.** Dough, 3D printing, extrusion, rheology, wheat flour, dairy components

**For citation:** Martekha AN, Toroptsev VV, Kaverina YE, Korotkiy IA. The Influence of Dairy Components on the Rheological Properties of Wheat Dough and Assessment of its Suitability for 3D Printing. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):711–721. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2538>

### Введение

В настоящее время пшеничное тесто используется в качестве основы или связующего вещества при приготовлении многих продуктов питания, содержащих компоненты растительного или животного происхождения, а также является одним из наиболее перспективных материалов для создания инновационных пищевых продуктов с использованием 3D-печати [1]. Добавление дополнительных ингредиентов в пшеничное тесто позволяет модифицировать состав и свойства его дисперсионной среды, в которой распределена дисперсная фаза, преимущественно состоящая из гранул крахмала и частиц вносимых ингредиентов. В зависимости от способа приготовления теста, его белки могут быть либо диспергированы в нем, либо объединены в белковые сети. Введенные ингредиенты достаточно инертны и не играют существенной роли в процессах

образования клейковинной сетки при механической обработке теста или набухания крахмальных гранул при клейстеризации. Реологические свойства приготовленного и обработанного теста могут быть изменены за счет наличия этих ингредиентов [2]. Фактически они являются наполнителем среды и потенциально способны увеличивать вязкость пасты в зависимости от их концентрации, размера и жесткости. Растворимые соединения в дисперсионной среде изменяют свойства клейковины (сахара, жиры, сывороточные белки, пектины) и кинетику процесса клейстеризации крахмала (сахара, жиры), что приводит к модификации реологических свойств пшеничного теста и потенциальной возможности его 3D-печати [3]. В концентрированных суспензиях свойства, определяющие их упругость, вязкость и текучесть, зависят главным образом от жесткости и формы частиц, контактных взаимодействий

(трения) между частицами и пространственной организацией (случайно или по определенной закономерности). Преобладание свойств жесткости частиц над остальными реологическими свойствами концентрированных систем было особенно отмечено авторами в экспериментах с образцами крахмала, имевшими различную способность к набуханию, положительно коррелировавшую с деформируемостью гранул [4].

Данная зависимость подтверждена результатами, полученными при исследовании агар-агаровых микрогелей, на жесткость частиц которых влияет степень связи полисахаридов [5]. Форма деформируемых частиц также влияет на вязкость концентрированных суспензий. Согласно работе о растительных клетках яблочного пюре, чем более неправильную форму имеют частицы суспензии, тем выше вязкость последней [6].

Вопрос о роли взаимодействия деформируемых частиц в суммарной вязкости концентрированных суспензий особенно подробно изучался в работах Y. Wang и др., исследовавших связанные частицы латекса [7]. Подобные суспензии имеют в своей структуре своеобразные блоки, состоящие из плотного ядра с сильными связями между частицами и расположенной вокруг него периферийной части из полимеров, в меньшей степени связанных с ядром. Концентрированная суспензия представляет собой гель с образованными в нем переплетающимися полимерными волокнами, усиливающими контактные взаимодействия между частицами. Авторы приходят к выводу, что величина вышеупомянутого блока зависит от плотности связей именно в его ядре, а не в периферийной части. Другими словами, сцепление между частицами влияет на упругость концентрированной суспензии меньше, чем на жесткость самих частиц. Однако стоит учитывать, что связывающие взаимодействия между частицами в основном электростатические, и образующиеся гели легко разбавляются, возвращаясь в состояние обыкновенной суспензии [8].

Жесткость частиц и состояние их поверхности в некоторой степени оказывают влияние на силы контактного взаимодействия и способность частиц деформироваться при малой скорости сдвига, а затем выравниваться по направлению потока при более высокой скорости сдвига. Подобное поведение концентрированной суспензии называется сдвиговым истончением. Реология системы слабо деформируемых частиц также определяется контактными взаимодействиями между частицами и пространственной организацией частиц [9, 10].

Стабильная структура системы может быть разрушена приложением сдвигового напряжения, превышающего пороговое, что обуславливает увеличение текучести в результате более интенсивных гидродинамических взаимодействий между дисперсионной средой и частицами с учетом энергии, рассеиваемой за счет вязкого трения движущихся частиц [11]. Под действием сдвига более «мягкая» частица деформируется

и увеличивает поверхность контакта с другими частицами, что позволяет им вместе лучше сопротивляться деформации [12]. Плотные системы деформируемых частиц обычно характеризуются пороговым значением напряжения, при превышении которого наблюдается сдвиговое истончение.

Дисперсионная среда разбавленной суспензии в основном оказывает влияние на вязкость последней, в то время как в концентрированных системах подобное влияние незначительно. Взаимодействие между элементами дисперсионной среды и частицами способно изменить реологические свойства концентрированной суспензии [13].

Молоко представляет собой коллоидную систему, в которой диспергированы жировые шарики и мицеллы казеина. Молочные жировые шарики на 97 % состоят из триацилглицерина и имеют диаметр от 4 до 5 мкм. Казеины, составляющие 80 % белков молока, связаны в форме сферических мицелл, размер которых варьируется от 50 до 600 нм при среднем значении 150 нм. Сывороточные белки, составляющие 20 % белков молока, относятся к классу растворимых белков [14].

За образование йогуртовых гелей отвечает агрегация молочных белков. Размер частиц микрогелей варьируется от нескольких микрометров до нескольких сотен микрометров. Распределение частиц микрогелей йогурта по размерам полидисперсное и зависит от процесса приготовления. Состав йогурта очень близок к составу молока. Йогурт состоит из 81–88 % воды, 3–5 % белка, 3–4 % жира, примерно 5 % углеводов (в основном лактозы), 1 % молочной кислоты и нескольких миллиграмм минералов [15].

Пшеничное тесто с добавлением молока или йогурта (с термической обработкой или без нее) различается главным образом размерами добавляемых частиц и рН дисперсионной среды (около 6,8 для молока и 4,5 для йогурта). Размер частиц микрогелей перемешанного йогурта, обычно не превышающий размеров гранул клейстеризованного крахмала, уменьшается по мере возрастания интенсивности сдвига [16]. Структура микрогеля может реорганизоваться или распасться на субъединицы под действием сдвига или уплотнения при добавлении молочных компонентов в пшеничное тесто. Мицеллы казеина деформируются в меньшей степени, чем гранулы клейстеризованного крахмала.

S. O. Serna-Hernandez и др. изучили свойства деформируемости и сжимаемости мицелл казеина. Авторы указывают, что мицелла состоит из деформируемых и недеформируемых участков [17]. При сжатии мягкие области деформируются и вытесняют воду из мицеллы, тогда как недеформируемые области сопротивляются сжатию. Жесткие области разделены и соединены вакуумом или деформируемыми областями, строение которых напоминает структуру губки [18]. По определению молочные микрогели относительно деформируемы. В исследованиях J. Chen и др. заметили, что деформируемость микрогелей увеличивается по мере

уменьшения плотности сети белковых агрегатов [19]. Согласно исследованиям N. Nussbaum и др., частицы молочных микрогелей уменьшаются до минимального размера, после чего разрушить их можно только под сильным давлением и / или сдвигом [20]. В этом состоянии молочный микрогель можно считать несжимаемым, хотя, насколько нам известно, исследований сжимаемости молочных микрогелей не проводилось.

Влияние добавления различных молочных белков (мицеллярных казеинов, казеинатов или сывороточных белков) на реологические свойства концентрированных крахмальных суспензий зависит от природы крахмала [21]. Вязкость нагретой суспензии крахмала маниоки увеличивается за счет введения сывороточных белков, термическая денатурация которых приводит к образованию геля [22]. Некоторые исследования показывают, что между гранулами крахмала и мицеллами казеина в микрогеле йогурта не существует физико-химических взаимодействий [23]. Эти авторы утверждают, что при клейстеризации суспензии, содержащей крахмал, казеины или казеиновые агрегаты, последние концентрируются в дисперсионной среде смеси и представляют собой неактивные жесткие частицы, заполняющие пространство между гранулами. Реассоциация амилозы и амилопектина после разрыва гранулы при повышении температуры исключает мицеллы казеина из образующейся клейковинной сетки, что приводит к агрегации мицелл и фазовому расслоению.

Пригодность к трехмерной печати пищевых продуктов можно спрогнозировать путем сравнения их реологических характеристик с аналогичными показателями эталонных образцов.

В работах Ю. Е. Кавериной и В. В. Торопцева проводились исследования по экструзионной трехмерной печати пшеничного теста, по результатам которых были определены критерии пригодности к 3D-печати теста без добавления молочных ингредиентов [24]. Эти характеристики (комплексная вязкость, тангенс угла механических потерь, модуль упругости, сила сопротивления) использовались в качестве эталонных для оценки свойств полученного в настоящем исследовании теста.

Целью данной работы являлось изучение влияния добавляемых молочных ингредиентов на реологические свойства пшеничного теста и его пригодность к экструзионной 3D-печати.

### Объекты и методы исследования

**Приготовление теста.** Рецепт теста для изготовления контрольного образца, по своим свойствам соответствующего эталонному для 3D-печати, предполагала смешивание муки из зерна твердой пшеницы высшего сорта (ГОСТ 31463-2012) с водой при различном гидромодуле (отношении массы воды к массе муки). В образцы, предназначенные для исследования влияния различных компонентов на свойства теста,

помимо муки и воды, добавлялось восстановленное сухое обезжиренное молоко, изолят сывороточного белка (ИСБ) или йогурт. Общая масса каждой порции теста являлась постоянной величиной на протяжении всех исследований и равнялась 600 г. Восстановленное обезжиренное молоко получали путем предварительного смешивания воды с различной массовой долей сухого молока в количестве 0–5 % от общей массы порции теста.

Смешивание основных ингредиентов и термомеханическую обработку теста с различной массовой долей воды осуществляли в термомиксере Thermomix TM6 (Vorwerk, Германия). В емкость термомиксера добавляли порошкообразные ингредиенты (мука, сахар и порошок изолята сывороточного белка) и заливали водой. После перемешивания этих компонентов в течение 5 мин мешалкой, вращающейся со скоростью 50 мин<sup>-1</sup>, в термомиксер добавляли восстановленное обезжиренное молоко и, в некоторых экспериментах, йогурты. Во время внесения ингредиентов скорость вращения мешалки увеличивали до 130 мин<sup>-1</sup>. После добавления всех ингредиентов, не прекращая перемешивать, температуру смеси повышали от 25 до 70 °С в течение 15 мин.

Для исследований был выбран обезжиренный йогурт, представляющий собой концентрированную суспензию (или микрогель), содержащий 6,5 % белков, способных удерживать сыворотку, 8 % углеводов и водную фазу, содержащую растворимые сахара и минералы. Средний размер частиц микрогелей составлял 27,5 мкм. В результате было получено тесто с фиксированной массовой долей влаги 65 %, содержанием йогурта 20, 40 и 72 % от общей массы.

**Содержание воды.** Содержание воды в муке и йогуртах определяли методом высушивания продукта до постоянной влажности. Порцию продукта массой около 5 г взвешивали на прецизионных весах неавтоматического действия GH-202 (AND, Япония) в бюксе известной массы  $m_0$  (точность до 0,001 г), алюминиевой – для муки и стеклянной – для йогурта соответственно. Бюксы высушивали в сушильном шкафу СНОЛ (ООО «НТФ «ТерМИКС-Наука», Россия) и охлаждали перед использованием. Затем образец помещали в сушильный шкаф, разогретый до температуры 130 °С (для муки) и 102 °С (для йогуртов) соответственно. Содержание воды в ингредиентах учитывали при расчете целевого общего содержания воды в тесте для содержания воды более 6 % по массе.

**Реологический анализ.** Реологические свойства приготовленного теста исследовали методом обратной экструзии в анализаторе текстуры «Структурометр СТ-2», (ООО «Лаборатория качества», Россия), оснащенном силоизмерительной ячейкой с нагрузкой 50 Н. В данном случае метод обратной экструзии являлся наиболее подходящим методом исследования поведения образцов при значительных деформациях, возникающих за счет действия силы, нормальной к

поверхности материала. В пробирку емкостью 40 мл и диаметром 28 мм помещали 35 г теста, полученного термомеханической обработкой на предыдущем этапе. Пробирки закрывали после наполнения и охлаждали в течение 1 ч до температуры 25 °С, после чего приступали к экспериментам. Чтобы минимизировать погрешность измерений, масса проб оставалась постоянной во всех опытах. При испытаниях каждый образец охлажденного теста помещали под поршневой зонд с диаметром диска 25 мм и толщиной 2 мм, который вдавливали в изделие со скоростью 1 мм/с на глубину не менее 35 мм. При контакте с зондом тесто сопротивляется деформации, сжимается и затем, по мере увеличения деформации, вытекает в кольцевое пространство шириной около 1,5 мм.

Нормальную силу сопротивления потоку  $F_M$  определяли как среднее значение сил, рассчитанных при введении поршня в образец на глубину 10 и 20 мм соответственно. Слои теста во всех образцах, расположенные на глубине проникновения поршня 10 мм, находились в состоянии текучести. Исследования вязкости на глубине проникновения поршня 20 мм проводились с целью выявления возможности уплотнения слоев теста в образце, что потенциально могло изменить значение силы сопротивления. Измерения проводились в трехкратной повторности для каждой группы образцов.

Исследования вязкоупругих свойств образцов пшеничного теста до термомеханической обработки и определение температуры начала клейстеризации проводили на ротационном вискозиметре Брукфильда DV3T (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., США). Логарифмическое изменение температуры начиналось через несколько секунд после сдвига теста при 25 °С.

Температуру увеличивали от 25 до 90 °С с темпом нагрева 4 °С/мин, при скорости сдвига 8 с<sup>-1</sup>.

**Статистическая обработка результатов.** Все испытания проводились в трехкратной повторности. Для установления значимости различий в полученных экспериментальных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) при уровне значимости 5 %. Управление данными и их анализ проводились с использованием программного обеспечения SPSS и представлялись как среднее значение ± стандартное отклонение.

### Результаты и их обсуждение

**Влияние добавления сухого молока на реологию пшеничного теста.** Комплексная вязкость и тангенс угла механических потерь ( $\tan \delta$ ) пшеничного теста с добавлением сухого молока (5 %) и без него, при различном содержании воды в зависимости от гидромодуля представлены на рисунке. Комплексная вязкость теста, приготовленного с добавлением сухого молока или без него, снижается при увеличении гидромодуля. При гидромодуле 1,75 показатели комплексной вязкости для образцов теста с добавлением сухого молока и без него отличаются незначительно. Таким образом, при содержании воды выше определенного значения добавление сухого молока не влияет на комплексную вязкость материала.

Для теста с гидромодулем 1,1 густая консистенция смеси муки и воды приводит к преждевременному прекращению процесса замеса до окончания термомеханической обработки. Тесто получается комковатым и неоднородным, что может быть объяснено значительной долей неклеястеризованных крахмальных гранул.

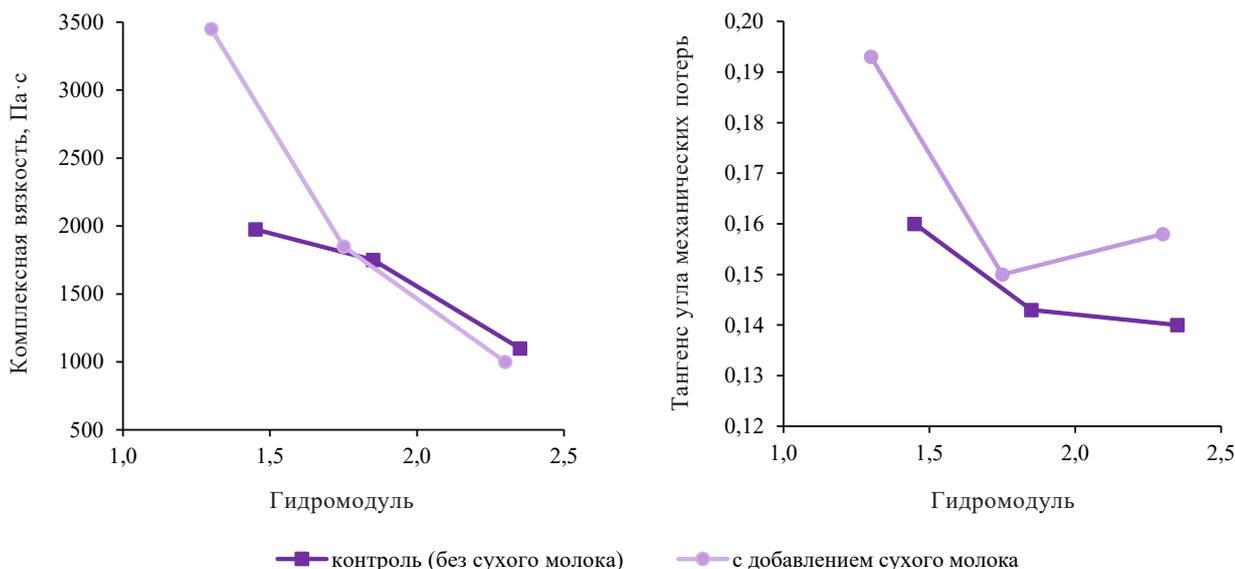


Рисунок. Вязкоупругие свойства теста с добавлением сухого молока и без него

Figure. Visco-elastic properties of dough with and without milk powder

При добавлении сухого молока вместо части муки при том же количестве добавленной воды гидромодуль увеличивается до 1,3. Важно обеспечить сохранение макроскопически однородной структуры теста до окончания термомеханической обработки. Отклонение значений вязкости, рассчитанное по повторным измерениям, для этого теста больше, чем для более жидкого, что свидетельствует об определенной неоднородности густого теста.

Изменение  $\tan \delta$  в зависимости от гидромодуля имеет ту же тенденцию, что и для комплексной вязкости. При гидромодуле, равном или превышающем 1,45, для теста, как с добавлением сухого молока, так и без него, значения  $\tan \delta$  находятся в диапазоне от 0,16 до 0,14. Эти результаты подтверждают, что добавление сухого молока слабо влияет на вязкоупругие свойства теста при избытке воды.

Образец теста с гидромодулем, меньшим или равным 1,3, демонстрирует  $\tan \delta$ , превышающий 0,19, что указывает на значительно более низкую степень структурирования по сравнению с образцом теста, имеющим более высокое значение гидромодуля. Значения модуля упругости ( $G'$ ) логически выше для теста с наименьшим гидромодулем (21,2 кПа для гидромодуля 1,3 теста с сухим молоком, против 12,1 кПа для гидромодуля 1,45 контрольного образца теста, таблица 2). Это показывает, что добавление сухого молока по условиям данного эксперимента не позволяет зафиксировать какого-либо заметного увеличения смазывающего эффекта. Жесткость частиц зависит от степени клейстеризации крахмала и структуры белковой матрицы, распределенной между гранулами [25].

При гидромодуле 1,45 содержание воды ограничивает клейстеризацию гранул крахмала, делая ее частичной. Исходя из этого, при гидромодуле 1,3 данный процесс протекает еще хуже. В зависимости от соотношения между всеми присутствующими компонентами (крахмалом, белками, пентозанами, молочными белками) термомеханическая обработка по-разному трансформирует и организует структуру теста, что, в свою очередь, влияет на реологические свойства.

Модуль упругости, измеренный при небольших деформациях без перемещения частиц теста относительно друг друга, отражает информацию о жесткости частиц [26]. Сила сопротивления потоку ( $F_M$ ) соответствует среднему значению силы, измеренной во время прохождения теста через узкое кольцевое простран-

ство при обратной экструзии. Сила сопротивления потока теста учитывает не только жесткость частиц, но и адгезию между ними и стенками экструзионного цилиндра. Поэтому представляет интерес определение соотношения  $F_M/G'$  для расчета величины адгезии, играющей важную роль в пластичности тестового пласта. Для этого свойства теста, приготовленного с добавлением сухого молока, изучали с помощью показателя  $F_M/G'$ . В таблице 1 приведены характеристики жесткости (модуль упругости), текучести (сила сопротивления) и адгезии ( $F_M/G'$ ), измеренных в тесте, приготовленном с добавлением сухого молока и без него, при массовой доле воды 65 и 70 % соответственно.

Для теста с массовой долей воды 65 %, а также для теста с массовой долей воды 60 % и добавлением 5 % сухого молока по массе, величины силы сопротивления имеют значения одного порядка. Жесткость частиц этих двух видов теста сильно различается (модуль упругости в первом случае почти в два раза меньше), что приводит к значительно большему показателю  $F_M/G'$  для теста, не содержащего сухого молока. При увеличении массовой доли воды до 70 % соотношение  $F_M/G'$  уменьшится и достигнет значения 1,07, очень близкого к аналогичному показателю теста с 60 % влаги и 5 % сухого молока. В данной рецептуре формирование белкового матрикса ограничено. Лактоза, содержащаяся в сухом молоке, может изменить структуру белков теста, что после их денатурации приведет к снижению адгезионных свойств теста. Согласно другому предположению, структура теста меняется за счет специфических взаимодействий между белками сыворотки и белками муки во время их денатурации [27].

**Влияние сывороточных белков на реологию пшеничного теста.** Добавление 5 % сухого молока в ранее описанных экспериментах соответствовало 2 % белка, из которых 20 % составлял сывороточный белок. В настоящем эксперименте в рецептуре теста сухое молоко массовой долей 0–5 % заменяли порошком изолята сывороточного белка, на 80 % состоящего из сывороточного белка. Общая массовая доля воды в тесте составляла 60 %, количество муки оставалось постоянным и равным 35 % от общей массы теста. Суммарная массовая доля сывороточных белков варьировалась от 0,5 % (в смеси, содержащей 5 % сухого молока и 0 % изолята сывороточного белка) до 4 % (в смеси с 0 % сухого молока и 5 % изолята сывороточного белка). Реологические свойства теста в

Таблица 1. Структурно-механические свойства теста с добавлением сухого молока и без него

Table 1. Structural and mechanical properties of dough with and without milk powder

Относительная влажность теста, %	Массовая доля сухого молока, %	Гидромодуль	Модуль упругости, кПа	Сила сопротивления, Н	$F_M/G'$ , м <sup>2</sup>
65 (контроль)	–	1,45	12,1 ± 1,5	23,4 ± 3,8	1,93
70	–	1,85	11,1 ± 1,8	11,9 ± 0,7	1,07
60	5	1,30	21,2 ± 3,6	21,4 ± 0,5	1,00

зависимости от содержания сухого молока и изолята сывороточного белка представлены в таблице 2.

Замена части сухого молока на сывороточный белок влияет на формирование текстуры изделий из пшеничного теста после термомеханической обработки. Увеличение содержания изолята сывороточного белка в смеси до 5 % вызывает снижение комплексной вязкости более чем в 2 раза по сравнению с вязкостью, измеренной для теста с 5 % сухого молока в составе. Тесто, содержащее 5 % изолята сывороточного белка в составе, по окончании термомеханической обработки показывает лишь незначительное увеличение вязкости, вытекает при наклоне емкости и фактически является непригодным для трехмерной печати.

Количество клейстеризованных крахмальных зерен настолько мало, что дисперсионная среда, окружающая крахмальные зерна, остается в жидком состоянии. При добавлении изолята сывороточного белка 1 до 2,5 % от общей массы порции теста наблюдается изменение текстуры, вызывающее снижение комплексной вязкости теста, но менее существенное, чем в предыдущем случае. Аналогично комплексной вязкости изменяется и модуль упругости в зависимости от процентного содержания сывороточных белков, что приводит к уменьшению эластичности теста. Значение  $\tan \delta$  для всех рассматриваемых рецептур составляет около 0,19, независимо от концентрации сывороточного белка.

Для образца с 5 % изолята сывороточного белка было получено стандартное отклонение ( $\pm 0,10$ ) значений величины  $\tan \delta$ , что указывает на гетерогенность структуры теста. Величина  $\tan \delta$  теста, содержащего сухое молоко и сывороточный белок, близка к измеренной для образца с гидромодулем 1,1, в котором процесс клейстеризации был затруднен, и превышает  $\tan \delta$  образцов теста с гидромодулями 1,45 и 1,85. Значительное снижение интенсивности процесса клейстеризации в присутствии сывороточных белков является причиной снижения вязкости.

Существует предположение, подтвержденное результатами исследований, состоящее в том, что при наличии в тесте из пшеничной муки сывороточных белков часть присутствующей влаги связывается с молекулами

этих белков вместо крахмальных зерен, что вызывает повышение температуры клейстеризации крахмала [28]. Если при нейтральном pH и комнатной температуре сывороточные белки связывают меньше воды, чем казеины (0,32 г воды/г белка), то при денатурации и агрегации их водоудерживающая способность значительно возрастает [29, 30].

Основной сывороточный белок сыворотки,  $\beta$ -лактоглобулин, термочувствителен и способен агрегироваться в сферические объекты размером от 1 до 100 мкм в зависимости от концентрации белка, параметров нагрева (температура, время пребывания, сдвиг) и окружающей среды (pH, ионная сила, присутствие других белков и т. д.) [31]. Во всех исследуемых нами образцах теста образование крупных связанных агрегатов сывороточных белков маловероятно из-за низкой концентрации последних и насыщенности среды гранулами, волокнами и нерастворимыми белками.

Изменения в структуре сывороточных белков, вызванные термической денатурацией, увеличивают их водоудерживающую способность и усиливают эффект связывания влаги их молекулами, что, при достижении определенной концентрации белков, приводит к затруднению процесса клейстеризации. В случае полной клейстеризации гранул крахмала они занимают большой объем и стабилизируют вязкость теста.

Чтобы оценить пригодность к 3D-печати полученных с добавлением 0–5 % изолята сывороточного белка образцов теста, оценивали показатели их текучести и адгезии. Сила сопротивления течению, измеренная методом обратной экструзии, модуль упругости и соотношение  $F_M/G'$  трансформированного теста в зависимости от концентрации сывороточного белка, представлены в таблице 2.

Жесткость и текучесть в целом развивается одинаково в зависимости от доли сывороточных белков. Самые высокие значения наблюдаются при небольшом количестве изолята сывороточного белка (0–1 %). Значения модуля упругости и силы сопротивления резко и линейно уменьшаются по мере увеличения доли сывороточного белка, заменяющего сухое молоко. Значения силы сопротивления теста, содержащего

Таблица 2. Реологические свойства теста в зависимости от концентрации молочных компонентов

Table 2. Effect of various concentrations of milk components on rheological properties of dough

Относительная влажность теста, %	Массовая доля изолята сывороточного белка, %	Массовая доля сухого молока, %	Гидромодуль	Комплексная вязкость, Па·с	Тангенс угла механических потерь, $\tan \delta$	Модуль упругости, кПа	Сила сопротивления, Н	$F_M/G'$ , м <sup>2</sup>
60	5	–	1,30	1500 ± 107	0,200 ± 0,050	9,00 ± 0,90	7,5 ± 0,5	0,800
60	2,5	2,5		2800 ± 75	0,185 ± 0,005	17,25 ± 0,60	20,0 ± 0,6	1,120
60	1	4		3450 ± 331	0,187 ± 0,010	21,25 ± 2,00	23,5 ± 2,0	1,075
60	–	5		3425 ± 95	0,186 ± 0,005	21,20 ± 0,60	21,4 ± 0,5	1,000

0–2,5 % изолята сывороточного белка, соотносятся со значением контрольного образца теста с гидромодулем 1,45. Однако соответствующие значения модуля упругости значительно выше, чем у контрольного образца, что свидетельствует о большей жесткости частиц теста.

Данные таблицы 2 демонстрируют, что отношение  $F_M/G'$  всех образцов теста, содержащих молочные ингредиенты, намного ниже, чем аналогичный параметр контрольного образца теста без добавления молочных ингредиентов с гидромодулем 1,45. По данному показателю образцы теста с массовой долей изолята сывороточного белка 0–2,5 % близки к контрольному образцу теста без добавления молочных ингредиентов с гидромодулем 1,85. Таким образом, добавление молочных ингредиентов изменяет адгезионные свойства частиц теста.

М. Wesołowska-Trojanowska и др. в своей работе продемонстрировали влияние добавления сывороточных белков на структуру геля белков глютена [32]. Авторы указывают на то, что денатурированные сывороточные белки способны препятствовать образованию геля денатурированных белков глютена посредством образования водородных и дисульфидных связей с субъединицами глютенина. Это приводит к образованию другой, более компактной формы организации геля из-за белка глютена, который становится менее эластичным, и, возможно, более хрупким при значительных деформациях. Более высокие значения  $\tan \delta$  соответствуют менее структурированному гелю. Снижение модуля упругости по мере увеличения доли добавленного изолята сывороточного белка свидетельствует о наличии менее эластичных частиц. Интерпретация различных уровней адгезии представляется более сложной задачей.

#### Влияние йогурта на реологию пшеничного теста.

В таблице 3 показано изменение реологических свойств теста, в том числе значения температуры начала клейстеризации, при которой вязкость теста начинает быстро увеличиваться в зависимости от гидромодуля и концентрации йогурта в тесте.

По сравнению с контрольным образцом (без добавления йогурта) введение в тесто йогурта в количестве 20 и 72 % вызывает повышение температуры начала клейстеризации на 3,4 и 7,4 °С соответственно. Чем выше концентрация йогурта, тем сильнее воз-

растает содержание сахара. Температура начала клейстеризации увеличивается сильнее при добавлении в тесто 40 % йогурта. Вид сахаров, находящихся в тесте, влияет на температуру начала клейстеризации. Причиной этого может быть наличие лактозы вместо сахарозы. Еще одно предположение заключается в том, что часть воды, находящейся в йогурте, содержится в микрогелях и гораздо менее доступна для клейстеризации крахмала. Следовательно, даже при одинаковом массовом содержании воды крахмал поглощает значительно меньшее ее количество, что может стать лимитирующим фактором процесса клейстеризации. Поэтому не все крахмальные гранулы клейстеризованы в конце стадии термомеханической обработки теста, содержащего йогурт.

Вязкость теста при температурной обработке возрастает по мере увеличения концентрации йогурта в тесте. Введение твердых предметов в тесто приводит к увеличению его вязкости перед нагревом и, следовательно, клейстеризации крахмальных зерен. Уровень консистенции варьируется в зависимости от состава дисперсионной среды, свойств и концентрации диспергированных в ней объектов.

Вязкость теста с массовой долей йогурта 20 %, имеющая значение 2100 Па·с, близка к вязкости контрольного образца теста с гидромодулем 1,45. Величины вязкости образцов теста с массовыми долями йогурта 40 и 72 % аналогичны друг другу, они выше, чем вязкость теста без добавления йогурта.

Значение  $\tan \delta$  находится в интервале 0,14–0,16 для всех полученных образцов теста, за исключением теста с добавлением 72 % йогурта, для которого было получено значение 0,187. Степень структурирования в этом тесте значительно ниже, чем в контрольном образце теста с массовой долей влаги 65 % и гидромодулем 1,45. Введение йогурта в тесто свыше определенной концентрации приводит к заметному изменению свойств частиц теста, образующихся в ходе термомеханической обработки.

Микрогели йогурта, с диспергированными в их структуре денатурированными белками, более жесткими, чем гранулы клейстеризованного крахмала, по всей видимости, при добавлении их в тесто способствуют увеличению жесткости частиц последнего. При добавлении в тесто йогурта в количестве 72 % крахмальные гранулы клейстеризуются лишь частично

Таблица 3. Реологические свойства теста в зависимости от концентрации йогурта

Table 3. Effect of yogurt concentrations on rheological properties of dough

Относительная влажность теста, %	Массовая доля йогурта, %	Гидромодуль	Температура начала клейстеризации, °С	Комплексная вязкость, Па·с	Тангенс угла механических потерь
65 (контроль)	–	1,45	60,30 ± 0,30	1975 ± 263	0,160 ± 0,010
65	20	1,60	63,70 ± 1,20	2100 ± 372	0,150 ± 0,007
65	40	1,75	65,50 ± 0,80	3200 ± 414	0,147 ± 0,007
65	72	2,10	67,70 ± 0,23	3300 ± 116	0,187 ± 0,030

из-за резкого повышения температуры, способствующего увеличению вязкости и большего количества несвязанной влаги. Эти два процесса, связанные с наличием большого количества микрогелей с жесткими частицами, в итоге позволяют получить тесто большей вязкости, чем тесто без добавления йогурта. В тесте с йогуртовыми микрогелями гранулы клейстеризованного крахмала находятся совместно с неклеястеризованными гранулами. Последние не взаимодействуют с белками глютена, которые после денатурации под воздействием тепла продолжают играть роль связующего звена между гранулами крахмала и микрогелями йогурта, но уже с меньшим количеством волокон глютена [33]. Это способствует более высоким значениям  $\tan \delta$ , выражающимся в увеличении вязкости.

Дополнительные исследования теста с добавлением йогурта в количестве от 40 до 72 % от общей массы позволяют подтвердить или опровергнуть существование плато оптимальной вязкости теста, соответствующего определенной массовой доле добавленного йогурта, расположенной между 40 и 72 %. При выходе за пределы этой оптимальной вязкости будет наблюдаться снижение эластичности теста и, соответственно, уменьшение степени структурированности теста, как и в экспериментах с добавлением сывороточного белка.

### Выводы

Результаты данного исследования позволили определить оптимальный состав пшеничного теста с добавлением молочных ингредиентов, характеризующегося реологическими показателями, соотносящимися со свойствами контрольного образца, что свидетельствует о пригодности данного теста к трехмерной печати.

Изучение характеристик теста различного состава демонстрирует влияние гидротермических преобразований крахмала и белков на реологические свойства теста. Пшеничное тесто с влажностью 65 % и содержанием (по массе) одного из компонентов – 5 %

сухого молока, 0–2,5 % изолята сывороточного белка или 20 % йогурта – имело значения реологических характеристик, находящихся в определенных диапазонах: комплексной вязкости – 1900–2100 Па·с, тангенса угла механических потерь – 0,14–0,16 и силы сопротивления – 20,0–23,5 Н. Полученные значения были близки к оптимальным показателям реологических характеристик контрольного образца, пригодного для 3D-печати.

Тенденция изменения реологических свойств хорошо согласуется со стабильностью размеров, которую можно использовать для количественной оценки и прогнозирования деформационного поведения материалов после 3D-печати. Результаты исследований могут быть использованы при разработке составов мучных изделий, предназначенных для изготовления методом экструзионной 3D-печати.

В дальнейшем планируется проведение экспериментов по 3D-печати пшеничного теста с добавлением молочных ингредиентов, а также определение оптимальных кинематических и геометрических параметров процесса экструзионной 3D-печати.

### Критерии авторства

А. Н. Мартеха руководил работой. Все авторы принимали участие в исследованиях, обработке данных и написании текста.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Contribution

A.N. Martekha supervised the research. Other team members performed the experiments, processed the obtained data, and wrote the manuscript.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

### References/Список литературы

1. Pulatsu E, Su J-W, Lin J, Lin M. Factors affecting 3D printing and post-processing capacity of cookie dough. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2020;61:102316. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102316>
2. Hussein AMS, Abd El-Aal HA, Morsy NM, Hassona MM. Chemical, rheological, and sensory properties of wheat biscuits fortified with local buckwheat. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(1):156–167. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-1-597>; <https://www.elibrary.ru/QBBVPY>
3. Cui Y, Chen J, Zhang S. The effect of degree of esterification of pectin on the interaction between pectin and wheat gluten protein. *Food Hydrocolloids*. 2023;136:108272. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108272>
4. Bredikhin SA, Martekha AN, Toroptsev VV, Kaverina YuE, Korotkiy IA. Sonochemical Effects on Wheat Starch. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(3):590–611. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2460>; <https://www.elibrary.ru/PMVGBF>
5. Kaneda I. Edible microgel as a texture modifier. *Food Science and Technology Research*. 2021;27(5):687–693. <https://doi.org/10.3136/fstr.27.687>

6. Leverrier C, Almeida G, Menut P, Cuvelier G. Design of Model Apple Cells Suspensions: Rheological Properties and Impact of the Continuous Phase. *Food Biophysics*. 2017;12:383–396. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9494-3>
7. Wang Y, Sun B, Hao Z, Zhang J. Advances in Organic–Inorganic Hybrid Latex Particles via In Situ Emulsion Polymerization. *Polymers*. 2023;15(14):2995. <https://doi.org/10.3390/polym15142995>
8. Asyul-Izhar AB, Bakar J, Sazili AQ, Goh YM, Ismail-Fitry MR. Emulsion Gels Formed by Electrostatic Interaction of Gelatine and Modified Corn Starch via pH Adjustments: Potential Fat Replacers in Meat Products. *Gels*. 2023;9(1):50. <https://doi.org/10.3390/gels9010050>
9. Borker NS, Koch DL. Shear rheology of a dilute suspension of thin rings. *Journal of Rheology*. 2023;67(3):723. <https://doi.org/10.1122/8.0000628>
10. Lee YJ, Jin H, Ahn KH. Brownian dynamics simulation on the parallel superposition rheology of a colloidal gel. *Journal of Rheology*. 2024;68(1):39–57. <https://doi.org/10.1122/8.0000672>
11. Kailasham R, Chakrabarti R, Prakash JR. Shear viscosity for finitely extensible chains with fluctuating internal friction and hydrodynamic interactions. *Journal of Rheology*. 2023;67(1):105–123. <https://doi.org/10.1122/8.0000498>
12. Kim YH, Shim TS, Kim JM. Lateral particle migration in shear-thinning colloidal dispersion. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2022;34:327–334. <https://doi.org/10.1007/s13367-022-00043-w>
13. Bredikhin SA, Martekha AN, Andreev VN, Soldusova EA, Karpova NA. Investigation of the structural and mechanical characteristics of mayonnaise with the addition of linseed oil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2022;979(1):012089. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/954/1/012014>
14. Huang QX, Yang J, Hu M, Lu W, Zhong K, Wang Y, et al. Milk fat globule membrane proteins are involved in controlling the size of milk fat globules during conjugated linoleic acid-induced milk fat depression. *Journal of Dairy Science*. 2022;105(11):9179–9190. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22131>
15. Gilbert A, Rioux L-E, St-Gelais D, Turgeon SL. Smoothing temperature and ratio of casein to whey protein: Two tools to improve nonfat stirred yogurt properties. *Journal of Dairy Science*. 2021;105(10):10485–10499. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20040>
16. Gilbert A, Rioux L-E, St-Gelais D, Turgeon SL. Studying stirred yogurt microstructure using optical microscopy: How smoothing temperature and storage time affect microgel size related to syneresis. *Journal of Dairy Science*. 2020;103(3):2139–2152. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16787>
17. Serna-Hernandez SO, Escobedo-Avellaneda Z, García-García R, Rostro-Alanis MdJ, Welti-Chanes J. Microscopical Evaluation of the Effects of High-Pressure Processing on Milk Casein Micelles. *Molecules*. 2022;27(21):7179. <https://doi.org/10.3390/molecules27217179>
18. Antuma LJ, Braitmaier SH, Garamus VM, Hinrichs J, Boom RM, Keppler JK. Engineering artificial casein micelles for future food: Preparation rate and coagulation properties. *Journal of Food Engineering*. 2024;366:111868. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111868>
19. Chen J, Lin K, Zhang L, Zhang Z, Miao S, Zheng B, et al. The effect of fat on properties and filling characteristics of myofibrillar protein emulsion microgels. *Food Bioscience*. 2022;50:102104. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102104>
20. Nussbaum N, Bergfreund J, Vialetto J, Isa L, Fischer P. Microgels as globular protein model systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022;217:112595. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112595>
21. Rahman MdA, Roy J, Mahomud MdS. Textural and antioxidant properties of mozzarella cheese fortified with dehydrated oyster mushroom flour. *Foods and Raw Materials*. 2023;11(2):251–258. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-2-574>; <https://www.elibrary.ru/PDZATD>
22. Diniyah N, Iguchi M, Nanto M, Yoshino T, Subagio A. Dynamic Rheological, Thermal, and Structural Properties of Starch from Modified Cassava Flour (MOCAF) with Two Cultivars of Cassava. *Industria: Jurnal Teknologi dan Manajemen Agroindustri*. 2023;12(1):89–101. <https://doi.org/10.21776/ub.industria.2023.012.01.8>
23. Wong SS, Wicklund R, Bridges J, Whaley J, Koh YB. Starch swelling behavior and texture development in stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*. 2019;98:105274. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105274>
24. Kaverina YuE, Toroptsev VV. 3D printing technology of pasta dough. International scientific and practical conference of young scientists and specialists of the Department of Agricultural Sciences of the Russian Academy of Sciences. 2023;(1):113–117. (In Russ.). [Каверина Ю. Е., Торопцев В. В. Технология трехмерной печати макаронного теста // Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. 2023. № 1. С. 113–117]. <https://www.elibrary.ru/TPYNU1>
25. Rakita S, Torbica A, Pezo L, Nikolić I. Effect of Climatic Conditions on Wheat Starch Granule Size Distribution, Gelatinization and Flour Pasting Properties. *Agronomy*. 2023;13(6):1551. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061551>
26. Bredikhin SA, Martekha AN, Andreev VN, Kaverina YuE, Korotkiy IA. Rheological Properties of Mayonnaise with Non-Traditional Ingredients. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2022;52(4):739–749. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2402>; <https://www.elibrary.ru/DNZOKM>
27. Zhang L, Zhou R, Zhang J, Zhou P. Heat-induced denaturation and bioactivity changes of whey proteins. *International Dairy Journal*. 2021;123:105175. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105175>

28. Shan S, Chen D, Federici E, Jones OG, Campanella OH. The effects of whey protein fibrils on the linear and non-linear rheological properties of a gluten-free dough. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:909877. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.909877>
29. Tang X, Liu J. A Comparative Study of Partial Replacement of Wheat Flour with Whey and Soy Protein on Rheological Properties of Dough and Cookie Quality. *Journal of Food Quality*. 2017;(1):1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/2618020>
30. Saadi S, Makhoulf C, Nacer NE, Halima B, Faiza A, Kahina H, *et al.* Whey proteins as multifunctional food materials: Recent advancements in hydrolysis, separation, and peptidomimetic approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2024;23(1):e13288. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13288>
31. Gasparini A, Buhler S, Faccini A, Sforza S, Tedeschi T. Thermally-Induced Lactosylation of Whey Proteins: Identification and Synthesis of Lactosylated  $\beta$ -lactoglobulin Epitope. *Molecules*. 2020;25(6):1294. <https://doi.org/10.3390/molecules25061294>
32. Wesółowska-Trojanowska M, Tomczyńska-Mleko M, Terpiłowski K, Kawecka-Radomska M. Ternary Biopolymer Based on Wheat Gluten, Whey Protein Concentrate and Montmorillonite. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2016;26:555–562. <https://doi.org/10.1007/s10904-016-0348-0>
33. Wouters AGB, Rombouts I, Fierens E, Brijs K, Blecker C, Delcour JA, *et al.* Foaming and air-water interfacial characteristics of solutions containing both gluten hydrolysate and egg white protein. *Food Hydrocolloids*. 2018;77:176–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.033>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2539>  
<https://elibrary.ru/RSPQGC>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Применение концентрата мицеллярного казеина в производстве твердых сычужных сыров



Е. И. Мельникова<sup>ORCID</sup>, Е. В. Богданова\*<sup>ORCID</sup>, Е. Б. Станиславская<sup>ORCID</sup>,  
Е. С. Рудниченко<sup>ORCID</sup>, М. С. Чекмарева<sup>ORCID</sup>

Воронежский государственный университет инженерных технологий<sup>ORCID</sup>, Воронеж, Россия

Поступила в редакцию: 15.04.2024  
Принята после рецензирования: 08.05.2024  
Принята к публикации: 04.06.2024

\*Е. В. Богданова: [ek-v-b@yandex.ru](mailto:ek-v-b@yandex.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-5053-2273>  
Е. И. Мельникова: <https://orcid.org/0000-0002-3474-2534>  
Е. Б. Станиславская: <https://orcid.org/0000-0002-0955-6238>  
Е. С. Рудниченко: <https://orcid.org/0009-0001-6176-2952>  
М. С. Чекмарева: <https://orcid.org/0009-0002-8003-5758>

© Е. И. Мельникова, Е. В. Богданова, Е. Б. Станиславская,  
Е. С. Рудниченко, М. С. Чекмарева, 2024



### Аннотация.

Важным резервом повышения товарности молока и выхода готового продукта является развитие технологий, обеспечивающих комплексную переработку исходного сырья. В сыроделии для этого применяют микрофильтрацию, позволяющую получать концентрат мицеллярного казеина и изменять в нем соотношение между казеином и сывороточными белками с 80:20 до 90:10–95:5. Цель данного исследования – разработка технологических рекомендаций для производства твердого сыра из нормализованной смеси с добавлением концентрата мицеллярного казеина.

Объектами исследования являлись сыропригодное сырое молоко, концентрат мицеллярного казеина, нормализованные смеси и твердые сыры, выработанные по технологии сыра Грюйер. Изучение химического состава и свойств объектов проводили с применением арбитражных и общепринятых методик.

В результате проведенных исследований установили, что при достижении pH = 6,1 мицеллы казеина в опытном образце разрушались быстрее. Нормализованная смесь с концентратом мицеллярного казеина образовала более упругий гель в результате сычужной коагуляции ввиду изменения соотношения между ионами кальция и фосфора, связанными с казеином (для нормализованной смеси с добавлением 10 % концентрата мицеллярного казеина составило 0,54, а для контрольного образца – 0,46). Это позволило увеличить выход готового продукта на 17 %, что можно объяснить большей степенью вовлечения белков в сычужный сгусток. Опытный образец характеризовался более продолжительной лаг-фазой развития молочнокислых микроорганизмов. Содержание влаги в обезжиренном веществе сыра в опытном образце на 15 % ниже, чем в контрольном, что свидетельствует о менее интенсивном развитии заквасочной микрофлоры в процессе созревания. Высокое содержание системы плазмينا в опытной нормализованной смеси (327 нмоль АМС/см<sup>3</sup>) относительно контрольной (149 нмоль АМС/см<sup>3</sup>) является предопределяющим фактором первичного протеолиза, при созревании образца сыра с добавлением концентрата мицеллярного казеина без участия заквасочных микроорганизмов. Для твердых сыров рекомендуется внесение в нормализованную смесь концентрата мицеллярного казеина в количестве не менее 10 %, что обеспечит получение продукта, отвечающего действующим стандартам качества.

**Ключевые слова.** Обезжиренное молоко, микрофильтрация, белки, сыр, нативные ферменты, созревание, выход

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках проекта с использованием мер государственной поддержки развития кооперации российской образовательной организации высшего образования и организации реального сектора экономики, в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства, предусмотренного ПП Российской Федерации от 09 апреля 2010 г. № 218, по теме «Создание высокотехнологичного импортозамещающего производства белковых ингредиентов на основе молочного сырья для продуктов здорового питания» (соглашение № 075-11-2022-020 от 07.04.2022 г.). Проект выполняется при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. НИОКТР проводятся в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий<sup>ORCID</sup>».

**Для цитирования:** Применение концентрата мицеллярного казеина в производстве твердых сычужных сыров / Е. И. Мельникова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024 Т. 54. № 4. С. 722–730. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2539>

## Micellar Casein Concentrate in Hard Cheese Production



Elena I. Melnikova<sup>ID</sup>, Ekaterina V. Bogdanova\*<sup>ID</sup>,  
Ekaterina B. Stanislavskaja<sup>ID</sup>, Elena S. Rudnichenko<sup>ID</sup>,  
Mariya S. Chekmareva<sup>ID</sup>

Voronezh State University of Engineering Technologies<sup>ROR</sup>, Voronezh, Russia

Received: 15.04.2024  
Revised: 08.05.2024  
Accepted: 04.06.2024

\*Ekaterina V. Bogdanova: [ek-v-b@yandex.ru](mailto:ek-v-b@yandex.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-5053-2273>

Elena I. Melnikova: <https://orcid.org/0000-0002-3474-2534>  
Ekaterina B. Stanislavskaja: <https://orcid.org/0000-0002-0955-6238>  
Elena S. Rudnichenko: <https://orcid.org/0009-0001-6176-2952>  
Mariya S. Chekmareva: <https://orcid.org/0009-0002-8003-5758>

© E.I. Melnikova, E.V. Bogdanova, E.B. Stanislavskaja, E.S. Rudnichenko,  
M.S. Chekmareva, 2024



### Abstract.

New technologies provide comprehensive processing of raw materials, increase the yield of the finished product, and improve the marketability of dairy products. For instance, microfiltration is popular in cheese production. It makes it possible to obtain micellar casein concentrate, as well as to change the ratio between casein and whey proteins from 80:20 to 90:10 or even 95:5. This article introduces some technological recommendations for hard cheese production from a standardized mix with a micellar casein concentrate.

The authors used standard research methods to study the chemical composition and properties cheese raw milk, micellar casein concentrate, standardized mixes, and hard Gruyere cheeses.

Casein micelles were destroyed faster at pH = 6.1 in the test sample. The standardized mix with micellar casein concentrate developed a more elastic gel. It happened as a result of rennet coagulation due to a change in the ratio between calcium and phosphorus ions associated with casein. It was 0.54 in the standardized mix with 10% micellar casein concentrate and 0.46 in the control sample. The yield of the finished product increased by 17% due to a more active protein involvement in the rennet curd. The test sample demonstrated a longer lag phase in the development of lactic acid microorganisms. The non-fat substance in the experimental cheese sample had a 15% lower moisture content than the control sample. This variable indicated a less intensive development of starter microflora during ripening. The experimental standardized mix had a higher content of plasmin (327 nmol AMC/cm<sup>3</sup>) than the control (149 nmol AMC/cm<sup>3</sup>). The ratio indicated that the cheese sample with micellar casein concentrate ripened without starter cultures due to primary proteolysis.

In this study, the optimal share of micellar casein concentrate to be added to standardized mix was 10%, and the experimental cheese was of high-quality.

**Keywords.** Skim milk, microfiltration, proteins, cheese, native enzymes, ripening, yield

**Funding.** The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauka) as part of research topic: High-Tech Import-Substituting Healthy Food Products from Dairy-Based Protein Ingredients (Agreement No. 075-11-2022-020, April 07, 2022). The R & D was performed by the Voronezh State University of Engineering Technologies<sup>ROR</sup> (VSUET) using state support for cooperation between institutions of higher education and real economy organizations, Decree of the Russian Federation Government (April 09, 2010, No. 218).

**For citation:** Melnikova EI, Bogdanova EV, Stanislavskaja EB, Rudnichenko ES, Chekmareva MS. Micellar Casein Concentrate in Hard Cheese Production. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):722–730. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2539>

### Введение

Молоко и молочные продукты входят в список Доктрины продовольственной безопасности и имеют первостепенное значение в рационе питания населения. В сложившейся политической и экономической

ситуации переработка молока становится все более затратной в силу целого ряда причин: дефицит молока-сырья, сезонность, снижение внутреннего спроса на молочную продукцию вследствие ухудшения платежеспособности населения, низкая рентабельность

и инвестиционная привлекательность, изношенность основных производственных фондов, недостаточная защищенность внутреннего рынка и др. [1].

Полноценное функционирование предприятий молочной отрасли России требует повышения эффективности производства. Это касается ресурсосбережения, т. к. затраты на сырье достигают 80 % себестоимости молочных продуктов [2, 3]. Важным резервом повышения товарности молока является развитие и совершенствование технологий, обеспечивающих комплексную безотходную переработку исходного сырья и повышающих выход готового продукта, особенно при производстве творога и сыра.

Этот подход в сыроделии реализуется посредством повышения эффективности использования молочных белков, степень перехода которых в молочный сгусток различна [4]. Казеин – основной белок молока – имеет степень перехода 87 %, а сывороточные белки – до 40 % [5]. Изменение соотношения «казеин:сывороточные белки» в сторону увеличения казеина позволит получить не только продукт с новыми органолептическими свойствами и физико-химическими показателями, но и повысить эффективность использования молочного сырья. Изменение нативного соотношения «казеин:сывороточные белки» (80:20) увеличивает выход сыра за счет повышения содержания связанной влаги [6, 7]. Количество захватываемого и удерживаемого пространственной сеткой сгустка молочного жира также коррелирует с содержанием казеина: чем выше содержание казеина, тем большая часть жира из нормализованной смеси перейдет в сыр. Повышение содержания жира в сгустке способствует снижению скорости синерезиса при разрезке, т. к. жировые шарики могут механически закупоривать капилляры и препятствовать выходу сыворотки.

В настоящее время в сыроделии существует несколько способов повышения массовой доли казеина в нормализованной смеси, в том числе микрофльтрация с использованием керамических мембран (размер пор – 0,1 мкм), позволяющая разделять казеин и сывороточные белки. Это приводит к увеличению содержания казеина в исходном молоке от 2,5 до 3,5 г/100 г, изменению соотношения между казеином и сывороточными белками с 80:20 до 90:10–95:5 и позволяет повысить выход сыра [8]. Применение микрофльтрационных мембран с размером пор 0,2 мкм для обработки молока, предварительно охлажденного ниже 5 °С, позволяет выделить из него фракцию  $\beta$ -казеина, плохо подвергающуюся сычужному свертыванию и образующую горькие пептиды [9]. При низких температурах  $\beta$ -казеин подвергается солюбилизации, поэтому в результате микрофльтрации переходит в пермеат. Удаление сывороточных белков и фракции  $\beta$ -казеина способствует повышению активности в ретентате комплекса нативного фермента плазмينا [10]. При внесении сычужного фермента в нормализованную смесь плазмин и плазминоген свертываются вместе с мицел-

лами казеина и концентрируются в сырном зерне. В дальнейшем комплекс плазмина принимает участие в протеолизе сырной массы при созревании, что особенно важно учитывать при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания, т. к. сычужный фермент полностью инактивируется еще до окончания технологического цикла.

Известны исследования по применению концентрата мицеллярного казеина в сырах с чеддеризацией сырной массы, а также твердых сырах с низкой температурой второго нагревания [11–15]. Определенный научный и практический интерес представляет совершенствование технологии твердых сыров с высокой температурой второго нагревания, выработанных с внесением концентрата мицеллярного казеина в нормализованную смесь для изменения соотношения между массовой долей белка и жира.

Цель выполненного исследования – разработка технологических рекомендаций для производства твердого сыра с высокой температурой второго нагревания из нормализованной смеси с добавлением концентрата мицеллярного казеина.

#### Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны сыропригодное молоко сырое от коров породы Монбельярд; концентрат мицеллярного казеина, полученный на установке микрофльтрации «Chemtron GmbH» (поставщик ООО «Хемтрон-Восток», г. Екатеринбург) с применением полупроницаемых керамических мембран с диаметром пор 0,1 мкм при  $t = 10–15$  °С и давлением 0,2–0,3 МПа; нормализованные смеси (контрольный образец и опытный образец с добавлением концентрата мицеллярного казеина), а также сыры с высокой температурой второго нагревания, выработанные по технологии сыра Грюйер [16]. Необходимость применения 10 % концентрата мицеллярного казеина от массы смеси в опытном образце установлена на основании стандартного коэффициента нормализации для данной группы сыров, определяемого отношением массовой доли белка к массовой доле жира в нормализованной смеси.

Экспериментальные исследования проводили в лабораториях «Молоко» ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ВНИМИ, г. Москва), ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», ПАО МК «Воронежский». Отбор проб и их подготовку к анализу осуществляли согласно ГОСТ 26809.1-2014 «Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молоко-содержащие продукты (с поправкой)». Исследование химического состава и свойств объектов проводили с применением стандартных арбитражных и общепринятых методик, а также модифицированных, усовершенствованных и специальных, выполненных с

применением современных приборов и информационных технологий (табл. 1). Соотношение между казеином и сывороточными белками в % от общего содержания истинного белка определяли экспериментально методом Кьельдаля для каждого объекта исследования, последовательно устанавливая массовую долю общего белка, небелкового азота, истинного белка, сывороточных белков и казеина в пробе.

После нормализации смеси подвергали пастеризации при температуре  $68 \pm 2$  °С, выдерживали в течение 30 с, затем охлаждали до  $34\text{--}35$  °С и вносили мезотермофильную закваску Chr. Hansen RST-743 (Chr. Hansen, Дания), состоящую из *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Streptococcus thermophilus*, и хлорид кальция из расчета 30 г сухой безводной соли на 100 кг нормализованной смеси с последующим созреванием в течение 10 мин. Затем в смесь вносили молокосвертывающий фермент СНУ-MAX Extra 600 IMCU (Chr. Hansen, Дания) в количестве 0,83 г/50 IMCU, перемешивали и оставляли в покое для образования сгустка при  $32 \pm 1$  °С в течение 37 мин для опытного образца и 50 мин для контрольного. Далее сгусток разрезали и проводили постановку зерна до размера  $5 \pm 1$  мм и его вымешивание при  $32 \pm 1$  °С в течение 5 мин. В контрольном образце проводили раскисление путем слива 30 % сыворотки и внесения такого же объема горячей пастеризованной воды. Для опытного образца раскисление не применяли. Перед проведением второго нагревания сгусток подогревали в течение 30 мин до  $45 \pm 2$  °С, зерно обоих образцов вымешивали при этой температуре 20 мин до достижения готовности к формованию, которое проводили наливом. Формы с сыром подвергали сначала самопрессованию в течение

30 мин, затем прессованию при давлении 10 кПа и температуре  $18\text{--}20$  °С в течение 3 ч с одной перепрессовкой. Выработанные головки сыра солили 12 ч в рассоле с концентрацией хлорида натрия 10 % масс. при  $10\text{--}12$  °С. Затем обсушивали 24 ч при 12 °С, покрывали латексом и отправляли на созревание при температуре  $12\text{--}14$  °С и относительной влажности воздуха 85 % в течение 80 сут.

**Определение размера мицелл казеина.** Для установления среднего диаметра мицелл казеина в 1 см<sup>3</sup> нормализованных смесей применяли лазерный дифракционный анализатор LS 13 320 XR (США, производитель Beckman Coulter) и метод динамического светорассеяния. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения «ADAPT Software».

**Упругость геля, образованного в процессе сычужной коагуляции** рассчитывали по отношению вязкости полученного сычужного сгустка к вязкости нормализованной смеси до внесения сычужного фермента. Вязкость измеряли с помощью ротационного вискозиметра Brookfield RVDV-II+Pro (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., США) с термостатированием образца, путем пересчета крутящего момента, необходимого для вращения шпинделя прибора с постоянной скоростью при погружении его в исследуемую среду.

**Содержание кальция** определяли в сыром молоке, нормализованных смесях и сыворотке титриметрическим методом по ГОСТ Р 55331-2012. Количество кальция, связанного с казеином, рассчитывали по разнице между нормализованными смесями и сывороткой.

**Содержание фосфора в казеине** рассчитывали по разности общего количества фосфора, количества

Таблица 1. Химический состав и свойства используемого сырья

Table 1. Chemical composition and properties of raw materials

Наименование показателя	Молоко коровье сырое	Концентрат мицеллярного казеина	Нормализованная смесь (контрольный образец)	Нормализованная смесь с добавлением 10 % концентрата мицеллярного казеина (опытный образец)
Массовая доля сухих веществ, %	$12,76 \pm 0,23$	$12,28 \pm 0,19$	$12,42 \pm 0,22$	$13,53 \pm 0,25$
Массовая доля жира, %	$4,00 \pm 0,15$	$0,15 \pm 0,05$	$3,65 \pm 0,10$	$4,00 \pm 0,15$
Массовая доля общего белка, %	$3,30 \pm 0,05$	$10,60 \pm 0,10$	$3,30 \pm 0,05$	$3,89 \pm 0,06$
Массовая доля сывороточных белков, %	$0,56 \pm 0,08$	$0,84 \pm 0,14$	$0,52 \pm 0,06$	$0,60 \pm 0,08$
Соотношение «казеин:сывороточные белки» в общей массовой доле истинного белка	80:20	92:8	81:19	85:15
Общее содержание кальция, %	$0,112 \pm 0,002$	$0,146 \pm 0,003$	$0,115 \pm 0,002$	$0,124 \pm 0,003$
Содержание фосфора, связанного с казеином, %	$0,178 \pm 0,003$	$0,166 \pm 0,003$	$0,165 \pm 0,003$	$0,161 \pm 0,003$
Массовая доля лактозы, %	$4,68 \pm 0,70$	< 0,70	$4,75 \pm 0,700$	$4,59 \pm 0,70$
Активная кислотность, ед. рН	$6,65 \pm 0,04$	$6,88 \pm 0,04$	$6,65 \pm 0,04$	$6,70 \pm 0,04$
Коэффициент нормализации	–	–	0,900	0,970
Коэффициент флокуляции	–	–	3,000	3,000

фосфора в сыворотке после осаждения белков и количества фосфора липидов, которые определяли методом мокрого озоления согласно [17].

**Активность плазмينا и плазминогена** определяли методом, описанным Richardson и Pearce, по концентрации флуоресцентного 7-амидо-4-метилкумарина (АМС), нмоль/г, выделяемого плазмином из специфического нефлуоресцентного пептида N-сукцинил-L-аланил-L-фенилаланил-лизил-7-амидо-4-метилкумарина [10, 18]. Флуориметрический анализ проводили при  $\lambda = 370$  нм и  $\lambda = 440$  нм на анализаторе Флюорат 02-5М (ООО «Льюмэкс», Санкт-Петербург, Россия). Содержание плазминогена рассчитывали путем вычитания активности нативного плазмينا из общей активности плазмина после активации плазминогена урокиназой [19].

**Обработка данных.** Каждый показатель был измерен не менее 5–10 раз в трехкратной последовательности. Расчеты проводились методами математической статистики с использованием программного обеспечения STATTECH (Статтех, Россия). Ограничениями экспериментальных исследований были ошибки и неопределенности используемых методов анализа. Нормальное распределение переменных по каждому показателю было определено с использованием критерия Шапиро-Уилка. Результаты выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение и медиана (минимальное значение ~ максимальное значение) для данных с нормальным и ненормальным распределением соответственно. Доверительный интервал –  $P > 0,95$  при условии, что рассчитанные величины были значимыми.

### Результаты и их обсуждение

Мицеллы казеина на 92 % состоят из белка и на 8 % – из соли (65 % кальция, 45 % неорганического фосфора, 35 % магния и 10 % цитратов от их общего содержания в молоке). Диаметр мицелл казеина колеблется от 20 до 300 нм. Частицы размером менее 50 нм представляют собой скорее субмицеллы или полимеры казеина, которые не принимают участие в образовании сычужного сгустка. С уменьшением размера мицелл увеличивается прочность сгустка и скорость его образования [20–23].

При фракционировании белков молока с применением микрофльтрации в полученном концентрате увеличивается средний размер мицелл казеина, а также концентрация фосфата кальция, связывающего между собой субмицеллы. Данная обработка позволяет удалить в пермеат белки размером менее 100 мкм (в соответствии с диаметром пор используемых полупроницаемых мембран). При понижении рН коллоидный фосфат кальция из мицелл казеина переходит в раствор, при рН ниже 5,2 они начинают распадаться с образованием геля. Скорость этого процесса будет зависеть от изменения размера мицелл казеина (рис. 1). По результатам проведенных исследований установлено, что при достижении рН = 6,1 мицеллы казеина

в опытном образце разрушались быстрее, чем в контрольном, что можно объяснить изменением солевого равновесия вследствие добавления концентрата мицеллярного казеина.

Поскольку дестабилизированные казеиновые частицы сначала образуют агрегаты и цепочки, которые при достижении критических размеров соединяются между собой продольными и поперечными связями и формируют сплошную пространственную сетку с дисперсионной средой в своих ячейках, то для образца с добавлением концентрата мицеллярного казеина улучшается процесс постановки сырного зерна за счет слияния все большего количества мицелл. В результате образуется более компактная структура, т. е. пространство между мицеллами сужается. Это способствует выдавливанию воды и более мелких частиц из матрицы. Таким образом ускоряется отделение сыворотки при разрезке и постановке сырного зерна. Размер мицелл казеина в этих условиях влияет на упругость полученного геля. Нормализованная смесь с концентратом мицеллярного казеина образует более упругий гель в результате сычужной коагуляции в сравнении с контролем (рис. 2). Этому способствует и повышенная концентрация ионов кальция в растворе. Выход сыра во многом определяет баланс солевого состава, в частности соотношение кальция:фосфор [24, 25]. Определено влияние изменения соотношения между ионами кальция и фосфора, связанными с казеином, на расход нормализованных смесей. Для нормализованной смеси с добавлением 10 % концентрата мицеллярного казеина это соотношение составило 0,54, а для контрольного образца – 0,46 (табл. 1 и 2), что позволило увеличить выход готового продукта на 17 % в результате большей степени вовлечения белков в сычужный сгусток.

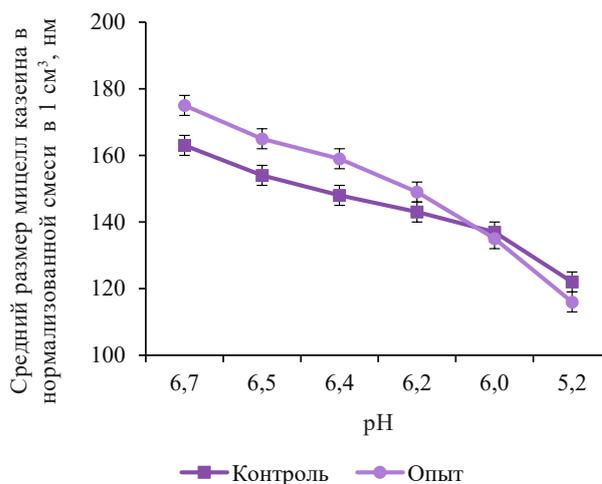


Рисунок 1. Изменение размера мицелл казеина в нормализованной смеси при снижении ее рН

Figure 1. Effect of lower pH on the size of casein micelles in standardized mixes

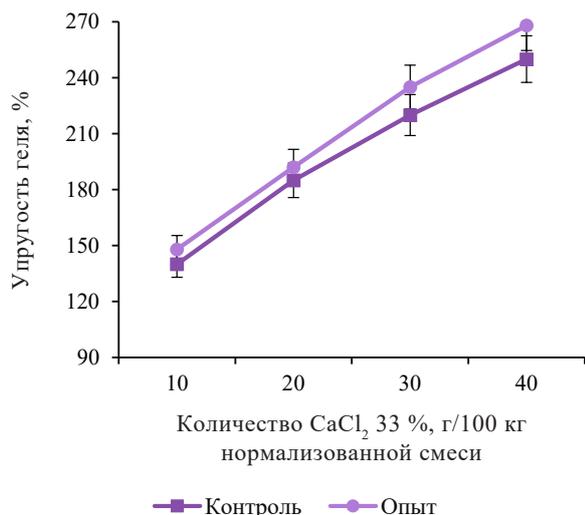


Рисунок 2. Влияние количества внесенного хлорида кальция на упругость геля, образованного исследуемыми нормализованными смесями

Figure 2. Effect of calcium chloride on gel elasticity in standardized mixes

В классической технологии твердых сыров температура второго нагревания варьируется от 47 до 58 °С, в зависимости от вида сыра и способности зерна к обезвоживанию. Во время второго нагревания изменяются свойства сырных зерен. В начале при нагревании до 45–50 °С повышается клейкость сырной массы, вследствие начинающегося плавления монокальций-параказеината. При повышении температуры до 50 °С клейкость зерна постепенно снижается, но усиливается дегидратация белка. Поэтому ввиду повышенного содержания казеина в опытном образце и ускоренного синерезиса в нем, при разрезке и обработке сгустка нецелесообразно поднимать температуру второго нагревания до 50 °С, т. к. это будет способствовать излишнему обезвоживанию сырной массы, а также появлению пороков готового продукта.

Изучены показатели, влияющие на технологический процесс и качество готового продукта (табл. 3 и 4). Внесение 10 % концентрата мицеллярного казеина с низким содержанием лактозы в нормализованную смесь не оказывало существенного влияния на развитие заквасочных культур (табл. 3). Опытный образец характеризовался более продолжительной лаг-фазой развития молочнокислых микроорганизмов. Содержание влаги в обезжиренном веществе сыра выше в контрольном образце (табл. 4), что свидетельствует о более интенсивном развитии заквасочной микрофлоры в процессе созревания вследствие активной работы протеолитических и липолитических ферментов, вырабатываемых молочнокислыми микроорганизмами. Влага в обезжиренном веществе сыра, является постоянным показателем и зависит только от степени синерезиса в технологическом процессе [26, 27].

Таблица 2. Химический состав и свойства подсырной сыворотки

Table 2. Chemical composition and properties of cheese whey

Наименование показателя	Контрольный образец	Опытный образец
Массовая доля сухих веществ, %	6,43 ± 0,38	5,71 ± 0,25
Массовая доля белка, %	0,92 ± 0,05	0,57 ± 0,04
Массовая доля жира, %	0,35 ± 0,05	0,30 ± 0,05
Массовая доля кальция в сыворотке, %	0,040 ± 0,001	0,037 ± 0,001
Плотность, кг/м <sup>3</sup>	1025 ± 1	1022 ± 1
pH	6,40 ± 0,04	6,46 ± 0,04
Кислотность, Т°	19,00 ± 0,50	19,00 ± 0,50

Таблица 3. Изменение активной кислотности образцов по ходу технологического процесса

Table 3. Active acidity during processing

Наименование показателя	Контрольный образец	Опытный образец
pH сыворотки после разрезки	6,50 ± 0,04	6,55 ± 0,04
pH сыра после пресса	5,70 ± 0,04	5,63 ± 0,04
pH сыра после посолки	5,64 ± 0,04	5,60 ± 0,04

Таблица 4. Химический состав и свойства зрелого сыра

Table 4. Chemical composition and properties of ripe cheese

Наименование показателя	Контрольный образец	Опытный образец
Массовая доля сухих веществ, %	68,38 ± 0,20	71,33 ± 0,20
Массовая доля жира в сухом веществе, %	48,93 ± 0,10	40,70 ± 0,10
Массовая доля жира, %	33,46 ± 0,15	29,08 ± 0,15
Массовая доля белка, %	26,35 ± 0,22	30,41 ± 0,22
Влага в обезжиренном веществе, %	47,52 ± 0,20	40,43 ± 0,20
Массовая доля поваренной соли, %	2,20 ± 0,10	2,50 ± 0,10
pH	5,55 ± 0,05	5,54 ± 0,05
Расход сырья, т/т готового продукта	9,00	7,50

Большинство жировых шариков и молочнокислых бактерий слишком велики, чтобы пройти через казеиновую сетку и поэтому остаются в сгустке после разрезки и постановки сырного зерна. С учетом высокого содержания жира в контрольном образце относительно опытного и степени усушки, а также одинаковых условий созревания обоих образцов, можно сделать вывод о том, что увеличение содержания влаги

Таблица 5. Активность системы «плазмин – плазминоген» в пастеризованных нормализованных смесях

Table 5. Plasmin-plasminogen system in pasteurized standardized mixes

Наименование образца	Ферментативная активность плазмينا, нмоль АМС/см <sup>3</sup>	Общая ферментативная активность системы «плазмин – плазминоген», нмоль АМС/см <sup>3</sup>
Опытный с добавлением 10 % концентрата мицеллярного казеина	327	1582
Контрольный	149	1021
Исходное молоко коровье сырое	163	1138

Таблица 6. Органолептический профиль исследованных образцов сыра

Table 6. Sensory profile of cheese samples

Наименование показателя	Опытный образец	Контрольный образец
Внешний вид	Корка ровная тонкая, чистая, без повреждений и тонкого подкоркового слоя, покрыта латексным составом	Корка ровная тонкая, чистая, без повреждений и тонкого подкоркового слоя, покрыта латексным составом
Вкус и запах	Выраженный сырный, сладковатый, без посторонних привкусов и запахов	Выраженный сырный, сладковатый, без посторонних привкусов и запахов
Консистенция	Плотная, твердая, слегка колющаяся	Плотная, твердая
Рисунок	На разрезе рисунок отсутствовал	На разрезе рисунок отсутствовал
Цвет	Слабо-желтый, равномерный по всей массе	Слабо-желтый, равномерный по всей массе

в обезжиренном веществе контрольного образца обусловлено способностью жира блокировать взаимодействие между частицами казеина, частично закупоривать капилляры и ингибировать синерезис в процессе обсушки и созревания головки.

Удаление при микрофильтрации из обезжиренного молока ингибиторов системы плазмينا, связанных с  $\beta$ -лактоглобулином, а также фракции  $\beta$ -казеина способствует повышению активности плазмينا, плазминогена и его активаторов, концентрирующихся на мицеллах казеина, а также переориентации субстратной специфичности этой ферментной системы с  $\beta$ -фракции на  $\alpha_{s2}$ -фракцию казеина [28]. Плазмин является термоустойчивым ферментом, его полная инактивация происходит только при воздействии температуры выше 80 °С не менее 10 мин [10, 29]. Важное значение имело изучение активности системы плазмينا в опытной нормализованной смеси в сравнении с контрольным образцом после пастеризации (табл. 5).

Высокое содержание системы плазмينا в опытной нормализованной смеси является предопределяющим фактором первичного протеолиза при созревании образца сыра с добавлением концентрата мицеллярного казеина без участия заквасочных микроорганизмов и получении готового продукта со стандартными органолептическими показателями (табл. 6).

Опытный образец в отличие от контрольного имел более плотную слегка колющуюся консистенцию и содержал незначительное количество кристаллов лактата кальция, что обусловлено высоким содержанием кальция и фосфора, связанных с казеином, в исходной нормализованной смеси, а также большим количе-

ством связанной с параказеином влаги в белковом стустке после его обработки.

### Выводы

Применение концентрата мицеллярного казеина в составе нормализованной смеси (в количестве 10 % от массы нормализованной смеси) при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания позволяет:

- снизить до 20–25 % продолжительность сычужной коагуляции ввиду изменения соотношения между кальцием и фосфором, связанными с казеином;
- исключить технологическую операцию по раскислению стустка из-за увеличения продолжительности лаг-фазы развития заквасочных культур в среде со сниженным содержанием лактозы и свободных аминокислот;
- увеличить выход готового продукта на 15–17 % вследствие повышения содержания казеина в общем белке и изменения соотношения «казеин:сывороточные белки»;
- получить более плотную консистенцию вследствие снижения содержания влаги в обезжиренном веществе сыра;
- обеспечить первичный протеолиз сырной массы без участия заквасочных культур для получения готового продукта со стандартными органолептическими показателями вследствие увеличения содержания в нормализованной смеси нативного фермента плазмينا в 2 раза и ферментов системы «плазмин – плазминоген» в 1,5 раза.

Дальнейшие исследования будут ориентированы на изучение изменений, происходящих с фракциями

казеина в процессе обработки сычужного сгустка и созревания сырной массы, полученных из нормализованной смеси с добавлением концентрата мицеллярного казеина.

#### Критерии авторства

Е. И. Мельникова руководила проектом, предложила методику проведения эксперимента, проводила консультации в ходе исследования. Е. В. Богданова готовила и оформляла рукопись, корректировала ее до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат. Е. Б. Станиславская проводила поиск литературных источников и патентный поиск по исследуемой проблеме. Е. С. Рудниченко организовала производственные испытания. М. С. Чекмарёва выполнила экспериментальные исследования.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Contribution

E.I. Melnikova managed the project, proposed the methodology of the experiment, and consulted during the research. E.V. Bogdanova wrote the manuscript, corrected it before submission to the editorial board and is responsible for plagiarism. E.B. Stanislavskaja conducted literature search and patent search on the problem under study. E.C. Rudnichenko organized the production trials. M.S. Chekmareva carried out experimental research.

#### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

#### References/Список литературы

1. Panasenko SV, Suray NM, Tatochenko AL, Rodinova NP, Ostroukhov VM. Sustainable Raw Material Base as a Factor of Competitiveness of Cheese-Making Enterprises. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2022;52(4):706–717. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2400>; <https://elibrary.ru/AWDXKN>
2. Ivanova S, Vesnina A, Fotina N, Prosekov A. An Overview of Carbon Footprint of Coal Mining to Curtail Greenhouse Gas Emissions. *Sustainability*. 2022;14(22):15135. <https://doi.org/10.3390/su142215135>; <https://elibrary.ru/RQTOAI>
3. Dolganyuk V, Sukhikh S, Kalashnikova O, Ivanova S, Kashirskikh E, Prosekov A, *et al.* Food Proteins: Potential Resources. *Sustainability*. 2023;15(7):5863. <https://doi.org/10.3390/su15075863>; <https://elibrary.ru/QGSLDC>
4. Illarionova EE, Kruchinin AG, Turovskaya SN, Bigaeva AV. Methods of Assessing Milk Proteins Coagulation as a Part of the Forecasting System of Technological Properties. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(3):503–519. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-3-503-519>; <https://elibrary.ru/PRTTXK>
5. Khrantsov AG, Dinyakov VA, Lodygin AD. Current methods of cheese enrichment with calcium salts. *Modern Science and Innovations*. 2022;(1):68–79. <https://doi.org/10.37493/2307-910X.2022.1.7>; <https://elibrary.ru/ZVECKB>
6. France TC, Kelly AL, Crowley SV, O'Mahony JA. Cold Microfiltration as an Enabler of Sustainable Dairy Protein Ingredient Innovation. *Foods*. 2021;10(9):2091. <https://doi.org/10.3390/foods10092091>
7. Hammam ARA, Kapoor R, Salunke P, Metzger LE. Compositional and Functional Characteristics of Feta-Type Cheese Made from Micellar Casein Concentrate. *Foods*. 2021;11(1):24. <https://doi.org/10.3390/foods11010024>
8. Salunke P, Marella C, Metzger LE. Microfiltration and Ultrafiltration Process to Produce Micellar Casein and Milk Protein Concentrates with 80% Crude Protein Content: Partitioning of Various Protein Fractions and Constituents. *Dairy*. 2021;2(3):367–384. <https://doi.org/10.3390/dairy2030029>
9. van der Schaaf JM, Goulding DA, Fuerer C, O'Regan J, O'Mahony JA, Kelly AL. A novel approach to isolation of  $\beta$ -casein from micellar casein concentrate by cold microfiltration combined with chymosin treatment. *International Dairy Journal*. 2024;148:105796. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105796>
10. Vélez MA, Perotti MC, Candioti MC, Bergamini CV, Hynes ER. Plasmin and coagulant activities in a minicurd model system: Study of technological parameters. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(9):7053–7062. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10799>
11. Abbas HM, Abd El-Gawad MAM, Kassem JM, Salama M. Application of fat replacers in dairy products: A review. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(2):319–333. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-612>; <https://elibrary.ru/MVBGHV>
12. Carter BG, Cheng N, Kapoor R, Meletharayil GH, Drake MA. Invited review: Microfiltration-derived casein and whey proteins from milk. *Journal of Dairy Science*. 2021;104(3):2465–2479. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18811>
13. Li B, Waldron DS, Tobin JT, Subhir S, Kelly AL, McSweeney PLH. Evaluation of production of Cheddar cheese from micellar casein concentrate. *International Dairy Journal*. 2020;107:104711. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104711>
14. Xia X, Tobin JT, Fenelon MA, Mcsweeney PLH, Sheehan JJ. Production, composition and preservation of micellar casein concentrate and its application in cheesemaking: A review. *International Journal of Dairy Technology*. 2022;75(1):46–58. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12829>

15. Chebotarev SN, Dibrova ZhN, Suray NM. Cheese Market in Moscow and the Moscow Region: A Regional Analysis. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(2):413–422. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-021-2-413-422>; <https://elibrary.ru/MLBGXC>
16. Melnikova EI, Stanislavskaya EB, Bogdanova EV, Shabalova ED. Micellar Casein Production and Application in Dairy Protein Industry. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2022;52(3):592–601. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2389>; <https://elibrary.ru/TETAWN>
17. Inikhov GS, Briо NP. Analysis methods for milk and dairy products. Moscow: Food Industry; 1971. 424 p. (In Russ.). [Инихов Г. С., Брио Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов. М.: Пищевая промышленность, 1971. 424 с.]
18. Denis TS, Humbert G, Gaillard J-L. Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: a revisited study. *Le Lait*. 2001;81(6):715–729. <https://doi.org/10.1051/lait:2001159>
19. Rampilli M, Raja V. Osservazioni sull'atti-vità di plasmina e plasminogeno nel formaggio. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*. 1998;49:341–50.
20. Tyopel A. Chemistry and physics of milk. Saint Petersburg: Profession; 2012. 824 p. (In Russ.). [Тёпел А. Химия и физика молока. СПб.: Профессия; 2012. 824 с.]
21. Smykov IT. The kinetics of milk gel structure formation studies by electron microscopy. *Food Systems*. 2023;6(4):547–553. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-547-553>; <https://elibrary.ru/KIUTZO>
22. Osintsev AM, Braginsky VI, Baburchin DS, Rynk VV. Dependence of viscoelastic properties of rennet gels on concentrations of milk fat and solids. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2015;37(2):53–61. (In Russ.). [Зависимость вязкоупругих свойств сычужных гелей от концентраций молочного жира и сухих веществ / Осинцев А. М. [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2015. Т. 37. № 2. С. 53–61.]. <https://elibrary.ru/UCQNHБ>
23. Smykov IT. Milk gelation mechanism. *Dairy Industry*. 2016;(9):45-48. (In Russ.). [Смыков И. Т. Механизм образования молочного геля // Молочная промышленность. 2016. № 9. С. 45–48.]. <https://elibrary.ru/WINQTV>
24. van de Langerijt T, O'Mahony JA, Crowley SV. The influence of sodium caseinate and  $\beta$ -casein concentrate on the physicochemical properties of casein micelles and the role of tea polyphenols in mediating these interactions. *LWT*. 2022;154:112775. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112775>
25. Lelièvre J. Influence of the casein/fat ratio in milk on the moisture in the non-fat substance in Cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 1983;36(4):119–120. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1983.tb02231.x>
26. France TC, Kelly AL, Crowley SV, O'Mahony JA. The effects of temperature and transmembrane pressure on protein, calcium and plasmin partitioning during microfiltration of skim milk. *International Dairy Journal*. 2020;114:104930. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104930>
27. Lepilkina OV, Lepilkina ON, Loginova IV. Eyes in cheese: reasons for formation and methods of assessment. *Food Systems*. 2021;4(3):180–189. (In Russ.). <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-3-180-189>; <https://elibrary.ru/CKXBBC>
28. Fedortsov NM, Budkevich EV, Evdokimov IA, Ryabtseva SA, Budkevich RO. Bovine serum albumin with gallic acid: Molecular modeling and physicochemical profiling. *Foods and Raw Materials*. 2022;10(1):163–170. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-1-163-170>; <https://elibrary.ru/GMZNUA>
29. France TC, Kelly AL, Crowley SV, O'Mahony JA. Influence of processing temperature on plasmin activity and proteolysis in process streams from cold microfiltration of skim milk. *International Dairy Journal*. 2023;140:105590. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105590>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2540>  
<https://elibrary.ru/GESSLE>

Оригинальная статья  
<https://fppt.ru>

## Сверхкритические экстракты бурых водорослей в технологии рыбных пресервов



О. В. Табакаева\*<sup>ID</sup>, А. В. Табакаев<sup>ID</sup>, Ю. В. Приходько<sup>ID</sup>,  
Т. В. Владыкина<sup>ID</sup>, С. В. Капуста<sup>ID</sup>

Дальневосточный федеральный университет<sup>ROR</sup>, Владивосток, Россия

Поступила в редакцию: 01.08.2024  
Принята после рецензирования: 28.08.2024  
Принята к публикации: 03.09.2024

\*О. В. Табакаева: [yankovskaya68@mail.ru](mailto:yankovskaya68@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0002-7068-911X>

А. В. Табакаев: <https://orcid.org/0000-0001-5658-5069>

Ю. В. Приходько: <https://orcid.org/0000-0002-6585-0546>

Т. В. Владыкина: <https://orcid.org/0000-0002-1449-721X>

С. В. Капуста: <https://orcid.org/0009-0005-8740-1249>

© О. В. Табакаева, А. В. Табакаев, Ю. В. Приходько,  
Т. В. Владыкина, С. В. Капуста, 2024



### Аннотация.

Изучение и выбор натуральных консервантов, применяемых в производстве рыбных пресервов для обеспечения их качества и безопасности, представляют собой важное направление исследований. Экстракты водорослей, в том числе и сверхкритические, проявляют антиоксидантные и антибактериальные свойства и могут использоваться в качестве антиокислителей и консервантов в пищевых системах. Цель данной работы – исследование влияния сверхкритических экстрактов бурых водорослей *Undaria pinnatifida* и *Ascophyllum nodosum* на качество и безопасность рыбных пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках.

Объектами исследования являлись опытные и контрольные образцы пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках. В опытных образцах в заливки вносили сверхкритические экстракты бурых водорослей в количестве 3 %. Исследуемые образцы хранили при температуре от 0 до 5 °С в течение 6 мес. Показатели безопасности устанавливали стандартными методами в аккредитованном испытательном центре «Океан» Дальневосточного федерального университета. Значение кислотного числа осуществляли нейтрализацией свободных жирных кислот, содержащихся в навеске, спиртовым раствором гидроксида натрия, перекисного числа – титриметрическим методом. Органолептические показатели (внешний вид, состояние заливки, консистенция, цвет, запах, вкус) определяли по пятибалльной шкале.

В результате исследований выявили, что сверхкритические экстракты бурых водорослей оказывали влияние на развитие микроорганизмов в пресервах в масляной и майонезной заливках при их хранении. КМАФАнМ в опытных образцах с добавлением сверхкритических экстрактов бурых водорослей приблизилось к контрольному значению в течение 6 мес. хранения, что обеспечивает возможность продления срока хранения на 2 мес. по сравнению с контрольными образцами. Значения перекисного и кислотного чисел опытных образцов были ниже контрольных. Пресервы из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках с сверхкритическими экстрактами морских бурых водорослей характеризовались более высокими органолептическими показателями в сравнении с контролем.

Сверхкритические экстракты морских бурых водорослей *U. pinnatifida* и *A. nodosum* оказывают влияние на качество и безопасность пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках. Введение таких экстрактов снижает скорость накопления КМАФАнМ, а также микроскопических грибов, замедляет процессы окисления и гидролиза липидного компонента пресервов.

**Ключевые слова.** Бурые водоросли, *Undaria pinnatifida*, *Ascophyllum nodosum*, сельдь тихоокеанская, сверхкритические экстракты, пресервы

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда<sup>ROR</sup> (Соглашение № 23-26-00197)

**Для цитирования:** Сверхкритические экстракты бурых водорослей в технологии рыбных пресервов / О. В. Табакаева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 731–744. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2540>

## Effect of Supercritical Extracts of Brown Algae on Fish Preserves



Oksana V. Tabakaeva\*<sup>ORCID</sup>, Anton V. Tabakaev<sup>ORCID</sup>, Yury V. Prikhodko<sup>ORCID</sup>,  
Tatyana V. Vladykina<sup>ORCID</sup>, Svetlana V. Kapusta<sup>ORCID</sup>

Far Eastern Federal University<sup>ORCID</sup>, Vladivostok, Russia

Received: 01.08.2024  
Revised: 28.08.2024  
Accepted: 03.09.2024

\*Oksana V. Tabakaeva: [yankovskaya68@mail.ru](mailto:yankovskaya68@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0002-7068-911X>

Anton V. Tabakaev: <https://orcid.org/0000-0001-5658-5069>

Yury V. Prikhodko: <https://orcid.org/0000-0002-6585-0546>

Tatyana V. Vladykina: <https://orcid.org/0000-0002-1449-721X>

Svetlana V. Kapusta: <https://orcid.org/0009-0005-8740-1249>

© O.V. Tabakaeva, A.V. Tabakaev, Y.V. Prikhodko, T.V. Vladykina, S.V. Kapusta, 2024



### Abstract.

Natural preservatives make it possible to maintain the quality and safety of fish products, which makes this matter a relevant and promising research area. This article describes the effect of supercritical extracts of marine brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* on the quality and safety of fish preserves from Pacific herring in oil and mayonnaise.

The experimental samples contained 3% of supercritical extracts of brown algae in the fillings. The samples were stored at 0–5°C for six months. The authors used standard research methods to study the microbiological, sensory, and physicochemical variables. The safety indicators were established by standard methods in the accredited test center of the Far Eastern Federal University. The acid number was determined by neutralizing free fatty acids with an alcohol solution of sodium hydroxide while the peroxide number was determined by the titrimetric method. The sensory profile included appearance, consistency, color, smell, taste, and the general state of the filling, which were assessed on a five-point scale.

The supercritical extracts of brown algae affected the development of microorganisms in both kinds of preserves during storage. The QMAFAnM in the test samples approached that in the control during 6 months of storage, which indicated an opportunity to extend the shelf life of the experimental samples by two months. The experimental samples had lower peroxide and acid numbers, as well as better sensory indicators.

In this research, supercritical extracts of *U. pinnatifida* and *A. nodosum* improved the quality and safety status of oil and mayonnaise herring preserves. The extracts reduced the accumulation of QMAFAnM and microscopic fungi while slowing down lipid oxidation and hydrolysis.

**Keywords.** Brown algae, *Undaria pinnatifida*, *Ascophyllum nodosum*, Pacific herring, supercritical extracts, preserves

**Funding.** The research was supported by the Russian Science Foundation<sup>ORCID</sup> (Agreement No. 23-26-00197)

**For citation:** Tabakaeva OV, Tabakaev AV, Prikhodko YV, Vladykina TV, Kapusta SV. Effect of Supercritical Extracts of Brown Algae on Fish Preserves. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):731–744. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2540>

### Введение

Рыба и продукты ее переработки являются одним из важных источников ценных нутриентов в питании современного человека. Рыба – питательный продукт, потребление которого способствует росту и защите организма от различных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые и ишемическая болезнь сердца, предотвращает рахит и психические заболевания у детей [1]. Рыба и рыбные продукты характеризуются высоким содержанием полноценных, сбалансированных и легко усвояемых белков, а также наличием липидов с эссенциальными уникальными жирными кислотами, относящимися к семействам омега 6 и

омега 3. Кроме того, рыба и рыбные продукты содержат достаточное количество разнообразных биологически активных соединений, таких как каротиноиды, жиро- и водорастворимые витамины, свободные аминокислоты, минеральные вещества [2]. Липиды рыб богаты полиненасыщенными жирными кислотами, особенно эйкозапентаеновой и докозагексаеновой, которые помогают предотвращать сердечно-сосудистые заболевания и ишемическую болезнь сердца, а также поддерживать психическое здоровье детей [3, 4]. Рыба содержит идеальный баланс всех необходимых витаминов, особенно витаминов А и D, является важным источником витамина В. Витамин В в основном пре-

дотвращает заболевания, связанные с дефицитом кальция, и рахит у детей. Минералы – это микроэлементы, которые варьируются от вида к виду, включая кальций, железо, цинк, селен, йод, фосфор и калий. Эти микроэлементы обладают высокой биодоступностью и антиоксидантными свойствами, которые полезны при лечении различных заболеваний [5].

Прогнозируется, что к 2025 г. производство рыбы во всем мире достигнет 196 млн т [6]. Спрос на рыбу значительно возрастает с увеличением численности населения планеты из-за ее приятных вкусовых качеств, эффективной переработки в корма и высокой коммерческой ценности [7]. Однако высокое количество водыв тканях рыбы, нейтральный рН, значительное содержание низкомолекулярных белковых молекул и наличие микробиоты, адаптированной к низким температурам, в совокупности создают благоприятные условия для биохимической и микробиологической порчи рыбы и рыбных продуктов с достаточно высокой скоростью. В настоящее время, 20 % рыбы теряет качество после вылова [8]. Определены три различных механизма порчи рыбы: аутолитическая (главным образом протеолиз, но также и липолиз), окислительная (окисление ненасыщенных жирных кислот) и микробиологическая (главным образом размножение психротолерантных видов с образованием биогенных аминов) [9–11].

С целью сохранения качества рыбы и продуктов ее переработки применяются традиционные методы консервирования (соленье, сушка и замораживание), приводящие к резкому снижению активности воды [12]. Переработка рыбы с получением рыбных пресервов позволяет получить традиционные продукты питания с высокой пищевой и биологической ценностью, т. к. технологии производства пресервов позволяют сохранять нативные макро- и микронутриенты гораздо лучше, чем в традиционных консервах. Однако отсутствие жесткой термической обработки является фактором, создающим благоприятные условия для развития процессов порчи, что приводит к необходимости использования консервантов. Пресервы, характеризующиеся низкой величиной активности воды, обладают более высокой стойкостью в хранении [11]. Исходя из этого, заливки, используемые в технологии рыбных пресервов, должны иметь низкую влажность, это относится к масляным и майонезным заливкам. Сельдь тихоокеанская является качественным сырьем, из которого изготавливается много пресервов. Рыбной промышленностью Российской Федерации выпускаются пресервы из неразделанной сельди специального,пряного посола и из разделанной на филе в мелкой расфасовке в разнообразных соусах и заливках, что позволяет производить пресервы из сельди в широком ассортименте с различными вкусовыми свойствами. Для изготовления пресервов «Сельдь специального посола» в качестве основного сырья используют сельдь-сырец или мороженую [13].

В процессе получения пресервной продукции из сельди тихоокеанской при созревании и хранении происходит значительное количество биохимических реакций, приводящих к изменениям азотсодержащих соединений, в первую очередь белков, активно происходит гидролиз и окисление липидов. Окисление липидов сельди приводит не только к появлению неприятного прогорклого вкуса и запаха, но и порче продукции, происходит накопление токсичных веществ – первичных и вторичных продуктов окисления [8]. Так как сельдь тихоокеанская является сырьем с высоким содержанием жира – содержание липидов может достигать 30 %, необходимо применять приемы, способствующие снижению окисления и повышению качества мало- и слабосоленой продукции из сельди [14]. Для уменьшения взаимодействия липидов рыбы с кислородом воздуха при производстве соленой продукции применяются вакуумирование, инактивация липолитических ферментов, внесение заливок и соусов, различных антиокислительных препаратов – синтезированных и натуральных [15, 16]. К натуральным антиокислителям относятся токоферолы, содержащиеся во многих растительных маслах. Яркими антиокислительными свойствами обладают фенолы, ароматические амины, хиноны, аскорбиновая и лимонная кислоты, прополис. Таким образом, натуральные пряности, копильные препараты, многие растительные компоненты могут выступать в качестве добавок-антиокислителей при производстве соленой продукции. Выделение из природного сырья веществ, обладающих антиокислительными свойствами, является одним из перспективных направлений.

В настоящее время изучается вопрос об использовании натуральных консервантов, поскольку многие потребители считают, что синтетические консерванты потенциально опасны для здоровья [13]. Исходя из этого, исследование, подбор и анализ натуральных консервантов, используемых в технологии рыбных пресервов для сохранения качества и безопасности данных пищевых систем, является актуальным направлением исследований.

Перспективным видом сырья, используемым в качестве источников веществ с антиоксидантной и антибактериальной активностью, которые могут влиять на качество пищевой продукции в процессе хранения, являются широко распространенные морские растения – водоросли. Существует значительное количество исследований, доказывающих высокий антиоксидантный потенциал водорослей [17–20]. Кроме исследования антиоксидантных свойств большое внимание уделяется исследованию антибактериальных свойств биологически активных соединений водорослей и использованию водорослей в качестве антибактериальных агентов [21–23]. Биологически активные соединения водорослей показали себя в качестве эффективных консервантов в мясных продуктах, напитках, рыбных продуктах [24–27].

Основными БАВ водорослей, проявляющими антибактериальные свойства, являются:

- полисахариды (альгинаты, фукоиданы и ламинаран), сульфатированные полисахариды *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* и *Undaria pinnatifida* продемонстрировали ингибирующий эффект на рост патогенных бактерий [28];
- липиды, жирные кислоты, в частности различные классы сульфолипидов, выделенные из двух видов *Ulva fasciata*, *Laurencia papillosa*, *Gingicithara cylindrica*, *Dilophus fasciola* и *Taonia Atomaria* [29–32];
- полифенолы, в частности флоротанины [33];
- каротиноиды, в частности фукоксантин [34].

Биологически активные соединения водорослей используются в виде экстрактов, получаемых различными способами с использованием классической экстракции органическими растворителями, микроволновой, ультразвуковой, сверхкритической и др. Сверхкритическая жидкостная экстракция – это экологичная аналитическая методика, используемая для извлечения ценных биологически активных соединений из сложных матриц [35]. По сравнению с другими традиционными методами экстракции, сверхкритическая экстракция обладает рядом преимуществ, а именно: использованием минимального количества растворителей, высокой селективностью экстракции, коротким временем обработки и низкой способностью экстракта к разложению, что свидетельствует о широком применении для получения различных биологически активных соединений [36]. Термодинамические свойства диоксида углерода, низкая токсичность, невысокая стоимость, низкая взрывоопасность, легкая доступность и экологичность делают его предпочтительным растворителем для процессов экстракции [37, 38].

Сверхкритическая экстракция находит применение для извлечения ценных биологически активных молекул из водорослей, в частности арктических бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus*. Экстракты арктических бурых водорослей вида *F. vesiculosus* содержат преимущественно жирные кислоты полифенолы, каротиноиды и хлорофиллы, обладают выраженной бактериальной, фунгицидной и иммуностимулирующей активностью [39, 40].

Экстракты водорослей, в том числе и сверхкритические, проявляют антиоксидантные и антибактериальные свойства и могут использоваться в качестве антиоксидантов и консервантов в пищевых системах.

Целью данной работы являлось исследование влияния сверхкритических экстрактов из бурых водорослей *U. pinnatifida* и *A. nodosum* на качество и безопасность рыбных пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках.

#### Объекты и методы исследования

В качестве растительной матрицы для получения сверхкритических экстрактов использовались сухие бурые водоросли *Undaria pinnatifida* и *Ascophyllum no-*

*dosum*. Обе водоросли произрастают в морях РФ, *A. nodosum* является промысловой водорослью в морях Северного Ледовитого океана, *U. pinnatifida* – условно промысловая водоросль Японского моря.

Бурая водоросль *A. nodosum* относится к семейству Fucaceae, является многолетним растением, прикрепляется подошвой, характеризуется слоевищем, достигающим 1–1,5 м в длину, на котором располагаются длинные, редко дихотомически ветвящиеся ветви, затем идут более короткие ветви [41, 42]. Водоросль характеризуется богатым составом, содержит значительное количество полифенолов, каротиноидов, биологически активных ПНЖК, экстракты проявляют различные виды биологической активности [43–45].

Бурая водоросль *U. Pinnatifida* (Harv.) Sur. является однолетним растением, анатомически состоит из пластины (таллома), стволика и ризоидов. Таллом обычно темно-зеленого или оливкового цвета, длина составляет 40–80 см, ширина – 25–45 см, тонкий, перепончатый, перисто-рассеченный. *U. pinnatifida* является достаточно широко распространенным видом бурых водорослей, в странах Юго-Восточной Азии считается объектом марикультуры. Основные места произрастания – литораль и сублитораль, глубина произрастания варьируется от 0,5 до 6,0 м, на скалистом и каменистом грунтах, у открытых, прибойных участков побережья. Достаточно часто данная водоросль образует небольшие заросли между крупными камнями и валунами. Встречается в сообществах с бурыми водорослями и морскими травами, является объектом культивирования в странах Юго-Восточной Азии. Биомасса до 2 кг/м<sup>2</sup>, плотность поселения 1–10 экз./м<sup>2</sup>, масса одного слоевища до 0,4 кг [42]. Особенности фитохимического состава является высокое содержание биологически активных соединений (полифенолов, ксантофиллов, высоконепредельных жирных кислот), обеспечивающих биологическую активность [46–48].

Сверхкритические экстракты получали с использованием системы TharSCF SFE-500 (Waters, Pittsburgh, США). В качестве модификатора использовали этанол, массовая доля 5 %. Скорость потока составляла 10 мл/мин для сверхкритического CO<sub>2</sub> и 1,0 мл/мин для этанола. Для экстракции использовали образцы по 28 г сухой бурой водоросли. Используемое давление – 300 бар, время экстракции – 60 мин, температура процесса – 60 °С.

Полученные экстракты представляли собой прозрачные жидкости светло-зеленого цвета со слабым характерным запахом водорослей. Фитохимический состав сверхкритических экстрактов *U. pinnatifida* и *A. nodosum* характеризовался высоким содержанием гидро- и липофильных соединений – жирных кислот, полифенолов, маннита и пигментов [49–52]. Ранее проведенными исследованиями доказаны высокие антиоксидантные свойства сверхкритического экстракта *U. Pinnatifida* и способность стабилизировать качество растительных масел при хранении [53, 54].

Опытные и контрольные образцы пресервов готовили следующим образом. В качестве сырья для получения пресервов использовали филе сельди тихоокеанской мороженое, которое размораживали, подвергали мойке и стеканию. Для изготовления соленого полуфабриката из филе сельди использовался способ охлажденного мокрого законченного посола при  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Массовая доля соли в соленом полуфабрикате составила  $4,50 \pm 0,02\%$ . После созревания филе подвергали стеканию с целью удаления избыточной влаги в течение 10 мин, затем подвергали подмораживанию до температуры в толще от  $-5$  до  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Подмороженное филе порционировали, фасовали в тару, вносили масляную и майонезную заливки. Массовая доля филе сельди составляла  $75,0\%$ , заливки –  $25\%$ . Заливкой для контрольных образцов пресервов являлось растительное соевое рафинированное масло (Контроль 1) и майонезная заливка (Контроль 2), полученная по стандартной технологии без сверхкрити-

ческого экстракта бурых водорослей, в качестве консерванта использовали бензоат натрия в соответствии с технологической инструкцией [55]. В опытных образцах сверхкритические экстракты бурых водорослей вносили в заливки в массовой доле  $3\%$ .

Показатели качества контрольных и опытных образцов пресервов из сельди тихоокеанской в заливках исследовали после приготовления и в процессе хранения при температуре от  $0$  до  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 6 мес.

Определение органолептических показателей проводили при температуре  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  через 12 ч после изготовления продукта (табл. 1). Дегустацию проводили сотрудники Дальневосточного федерального университета в количестве 12 человек. Органолептические показатели определяли в следующей последовательности: внешний вид, состояние заливки, консистенция, цвет, запах, вкус. Для оценки органолептических характеристик пресервов использована пятибалльная шкала согласно рекомендациям Т. М. Сафроновой [56].

Таблица 1. Шкала органолептической оценки пресервов из филе сельди в заливке

Table 1. Sensory evaluation scale for marinated herring preserves

Показатель	Количество баллов, характеристика показателей				
	5	4	3	2	1
Запах	Свойственный созревшей сельди	Приятный, созревшей сельди	Слегка неприятный запах окисленного жира	Порочащий	Неприятный, резкий, кислый
Цвет	Свойственный созревшей сельди, светло-бежевый	Бежевый	Бежевый с незначительными пожелтениями	Желтоватый	Выраженное пожелтение
Консистенция	Нежная, сочная, не дряблая	Умеренно мягкая	Слегка ослабленная	Слабая	Мазеобразная
Вкус	Приятный, свойственный созревшей сельди	Свойственный созревшей сельди	Кисловатый	Неприятный кислый	Прогорклый, свойственный старой рыбе, кислый
Заливка масло / майонез	Прозрачная, приятного светло-желтого цвета, без посторонних привкуса и запаха, вкус присущий растительному маслу с привкусом соленой сельди / однородной сметанообразной консистенции, желтовато-кремового, однородного по всей массе цвета, вкус нежный, слегка острый, запах свойственный данному виду продукта, без постороннего запаха и привкуса	Прозрачная, желтого-цвета, без посторонних привкуса и запаха, вкус присущий растительному маслу с привкусом соленой сельди / однородной сметанообразной консистенции, желтовато-кремового, неоднородного по всей массе цвета, вкус кисловатый, слегка острый, запах свойственный данному виду продукта, без постороннего запаха и привкуса	Прозрачная, темно-желтого цвета, без посторонних привкуса и запаха, вкус присущий растительному маслу с привкусом соленой сельди / однородной сметанообразной консистенции, желтовато-кремового, неоднородного по всей массе цвета, вкус кислый, слегка острый, запах свойственный данному виду продукта, без постороннего запаха и привкуса	Непрозрачная, темно-желтого цвета, кислый вкус / неоднородной сметанообразной консистенции, присутствует расслоение, желтовато-кремового, неоднородного по всей массе цвета, вкус неприятно кислый, слегка острый, запах несвойственный данному виду продукта	Непрозрачная, темно-желтого цвета, прогорклый вкус / неоднородной консистенции, расслоение на воду и сгустки, желтого, неоднородного по всей массе цвета, вкус, запах неприятный, несвойственный данному виду продукта

Определение кислотного числа осуществляли нейтрализацией свободных жирных кислот, содержащихся в навеске, спиртовым раствором гидроксида натрия – ГОСТ 31933-2012, перекисного числа по ГОСТ Р 51487-99. Показатели безопасности определяли стандартными методами в аккредитованном испытательном центре «Океан» Дальневосточного федерального университета. Определение КМАФАнМ осуществляли согласно ГОСТ 10444.15-94, *Staphylococcus aureus* – ГОСТ 10444.2-94, сульфитредуцирующих клостридий – ГОСТ 10444.9-88, патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл и *Listeria monocytogenes* – ГОСТ 31659-2012, *Vibrio parahaemolyticus* – ГОСТ ISO/TS 21872–2013. Количество дрожжеподобных и плесневых грибов в пресервах определяли по ГОСТ 10444.12-88. Буферность определяли титриметрическим методом по ГОСТ 19182–89.

**Статистический анализ.** Данные были получены в виде среднего и стандартного отклонения (СО) и проанализированы с помощью односторонней ANOVA в SPSS версии 11.5 для Windows. Разница в средних значениях считалась достоверной при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Исследование контрольных и опытных образцов пресервов из сельди тихоокеанской в заливках в течение 6 мес. хранения показало закономерное увеличение КМАФАнМ. Динамика изменения численности микроорганизмов в хранении представлена на рисунке 1.

Представленные данные демонстрируют, что в контрольном образце, как с использованием масляной, так и майонезной заливки, количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорга-

низмов практически достигает контрольного значения и определяет срок годности 4 мес. Нарастание численности микроорганизмов в контрольных образцах идет существенно быстрее, чем в опытных с использованием сверхкритических экстрактов бурых водорослей, что позволяет утверждать об их антибактериальных свойствах. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в опытных образцах приближается к контрольному значению в течение 6 мес. хранения, что обеспечивает возможность продлить срок хранения на 2 мес. по сравнению с контрольными образцами. Необходимо отметить, что сверхкритический экстракт *Undaria pinnatifida* снижает интенсивность развития микроорганизмов немного ниже, чем сверхкритический экстракт *Ascophyllum nodosum*, что вероятно определяется составом и содержанием биологически активных веществ с антибактериальной направленностью.

Кроме изменения численности микроорганизмов исследовали другие микробиологические показатели безопасности контрольных и опытных образцов пресервов из сельди тихоокеанской в процессе хранения в течение 6 мес., результаты представлены в таблице 2.

Первоначально, после изготовления во всех образцах пресервов, как контрольных, так и опытных, санитарно-показательные, условно-патогенные и патогенные формы микроорганизмов не обнаружены, отсутствовали микроскопические грибы и дрожжи. После 4 мес. хранения в контрольных образцах, как в масляной, так и майонезной заливке, в 0,01 г были обнаружены бактерии группы кишечной палочки и в 1,0 г – непатогенные штаммы бактерий рода *Staphylococcus*. Во всех опытных образцах пресервов с сверхкритическими

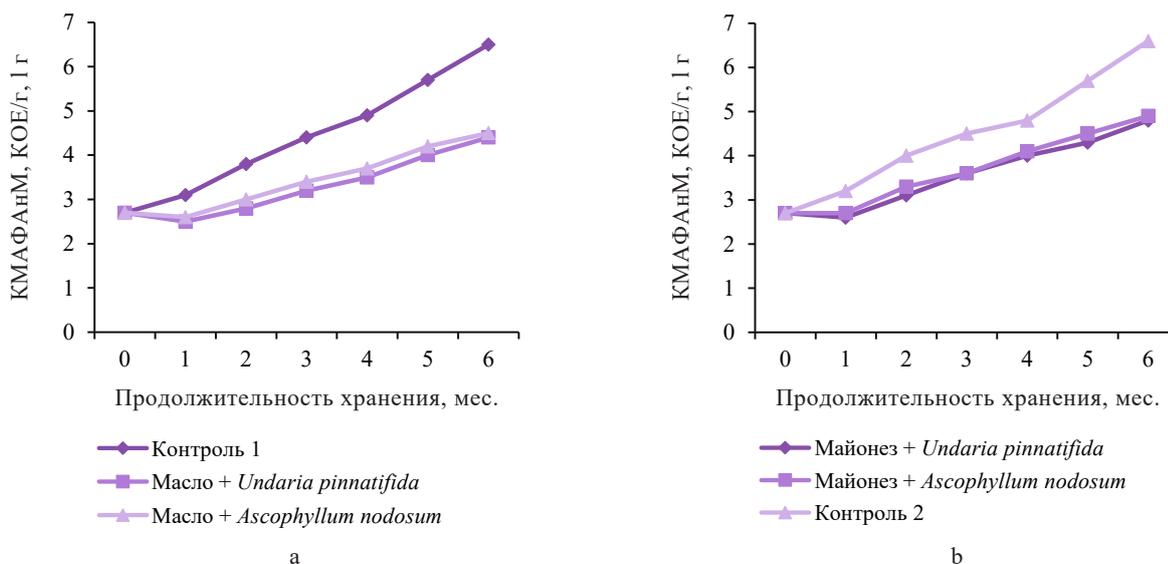


Рисунок 1. Изменение численности микроорганизмов при хранении пресервов: а – в масляной заливке, б – в майонезной заливке

Figure 1. Microbial count in Pacific herring preserves during storage: a – oil, b – mayonnaise

Таблица 2. Микробиологические показатели безопасности пресервов из сельди тихоокеанской в заливках

Table 2. Microbiological safety indicators of Pacific herring marinated in oil and mayonnaise

Наименование показателя	ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», Приложение 1	Масляная заливка			Майонезная заливка		
		Контроль 1	<i>с Undaria pinnatifida</i>	<i>с Ascophyllum nodosum</i>	Контроль 2	<i>с Undaria pinnatifida</i>	<i>с Ascophyllum nodosum</i>
Получение							
Бактерии группы кишечной палочки (коли-формы), в 0,1 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1 г	не допускается						
Патогенные, в т. ч. сальмонеллы в 25 см <sup>3</sup>	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Сульфитредуцирующие клостридии, в 1 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Listeria monocytogenes</i> , в 25 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , в 0,01 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Плесени, КОЕ/г	не более 10	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Дрожжи, КОЕ/г	не более 100	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
1 мес. хранения							
Бактерии группы кишечной палочки (коли-формы), в 0,1 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Патогенные, в т. ч. сальмонеллы в 25 см <sup>3</sup>	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Сульфитредуцирующие клостридии, в 1 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Listeria monocytogenes</i> , в 25 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , 0,01 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Плесени, КОЕ/г	не более 10	3,0 ± 0,1	н/о	н/о	5,0 ± 0,2	н/о	н/о
Дрожжи, КОЕ/г	не более 100	15,0 ± 0,7	н/о	н/о	20,0 ± 0,8	н/о	н/о
4 мес. хранения							
Бактерии группы кишечной палочки (коли-формы), в 0,1 г	не допускается	о	н/о	н/о	о	н/о	н/о
<i>Staphylococcus aureus</i> , 1 г	не допускается	о	н/о	н/о	о	н/о	н/о
Патогенные, в т. ч. сальмонеллы в 25 см <sup>3</sup>	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Сульфитредуцирующие клостридии, в 1 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Listeria monocytogenes</i> , в 25 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , 0,01 г	не допускается	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Плесени, КОЕ/г	не более 10	10	2	3	12	4	5
Дрожжи, КОЕ/г	не более 100	95	20	22	99	25	30
6 мес. хранения							
Бактерии группы кишечной палочки (коли-формы), в 0,1 г	не допускается	о	н/о	н/о	о	н/о	н/о
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1 г	не допускается	о	н/о	н/о	о	н/о	н/о
Патогенные, в т. ч. сальмонеллы в 25 см <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Сульфитредуцирующие клостридии, в 1 г	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Listeria monocytogenes</i> , в 25 г	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , в 0,01 г	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Плесени, КОЕ/г	не более 10	55	9	10	75	10	10
Дрожжи, КОЕ/г	не более 100	255	90	95	300	95	99

Примечание: о – обнаружены; н/о – не обнаружены.

Note: o – detected; n/o – not detected.

экстрактами бурых водорослей данные виды микроорганизмов не обнаружены в течение 6 мес. хранения.

Представители условно-патогенной и патогенной группы бактерий (*Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, сальмонелл и *Listeria monocytogenes*) отсутствовали в контрольных и опытных образцах пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках как после изготовления, так и в процессе хранения.

Дрожжи и плесени в пресервах из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках после изготовления пресервов отсутствовали как в контрольных, так и опытных образцах. Хранение в течение 1 мес. продемонстрировало наличие в указанной массе контрольных образцов пресервов микроскопических грибов: плесени были выявлены в количестве 5–10 клеток, дрожжи – в количестве 15–20 клеток. В опытных образцах микроскопические грибы после 1 мес. хранения не обнаружены. Увеличение продолжительности хранения привело к существенному увеличению численности микроскопических грибов в контрольных образцах – плесени – 10–12 клеток/г, дрожжи – 95–99, через 6 мес. хранения – плесени – 55–75, дрожжи – 255–300. Причинами являются отсутствие факторов ингибирования или стабилизации развития микроорганизмов. Факторы температуры и pH не влияют на плесени и дрожжи, содержание соли в концентрации не более 5 % и бензоат натрия проявляют очень слабое действие на них. В опытных образцах пресервов из тихоокеанской сельди в масляной и майонезной заливках с сверхкритическими экстрактами бурых водорослей численность дрожжей не превышала 30 клеток, плесени были выявлены единичными клетками (2–5 клеток)

только после хранения в течение 4 мес. При хранении в течение 6 мес. численность микроскопических грибов увеличилась, но не достигла верхнего предела.

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что сверхкритические экстракты бурых водорослей ингибировали развитие плесеней и дрожжей в процессе хранения пресервов из тихоокеанской сельди в масляной и майонезной заливках.

Помимо исследования влияния сверхкритических экстрактов бурых водорослей на изменение микробиологических показателей пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках дана оценка изменения кислотного и перекисного чисел липидного компонента пресервов, как показателей качества и безопасности. Полученные данные представлены на рисунках 2, 3.

Процессы окисления и гидролиза липидов пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках в процессе хранения в контрольных образцах протекают с более высокой скоростью, чем в опытных образцах, о чем говорит динамика изменения кислотного и перекисного чисел.

Кроме кислотного и перекисного чисел, достаточно важным физико-химическим показателем качества пресервов из тихоокеанской сельди является буферность, нормальное значение которой составляет 130–180 градусов. Изменение буферности пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках в процессе хранения представлено на рисунке 4.

В контрольных образцах пресервов из тихоокеанской сельди значение буферности практически достигало верхнего порогового значения после 3 мес. хранения. При использовании в составе заливок для

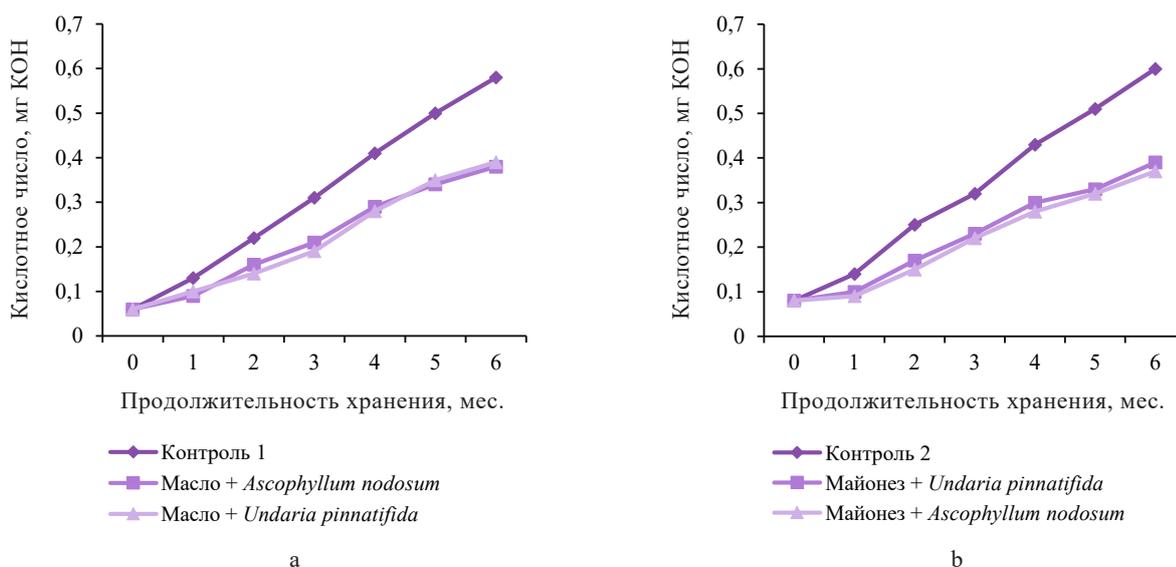


Рисунок 2. Динамика изменения кислотного числа липидного компонента пресервов из сельди тихоокеанской при хранении: а – в масляной заливке, б – в майонезной заливке

Figure 2. Acid number of lipid component in Pacific herring preserves during storage: a – oil, b – mayonnaise

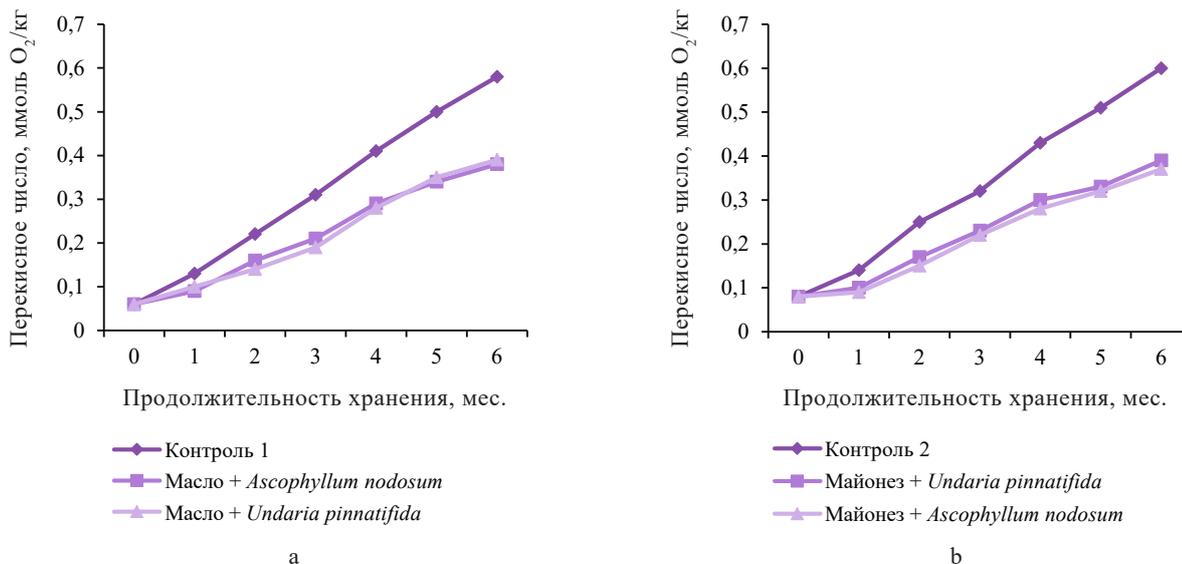


Рисунок 3. Динамика изменения перекисного числа липидного компонента пресервов из сельди тихоокеанской при хранении: а – в масляной заливке, б – в майонезной заливке

Figure 3. Peroxide number of lipid component in Pacific herring preserves during storage: a – oil, b – mayonnaise

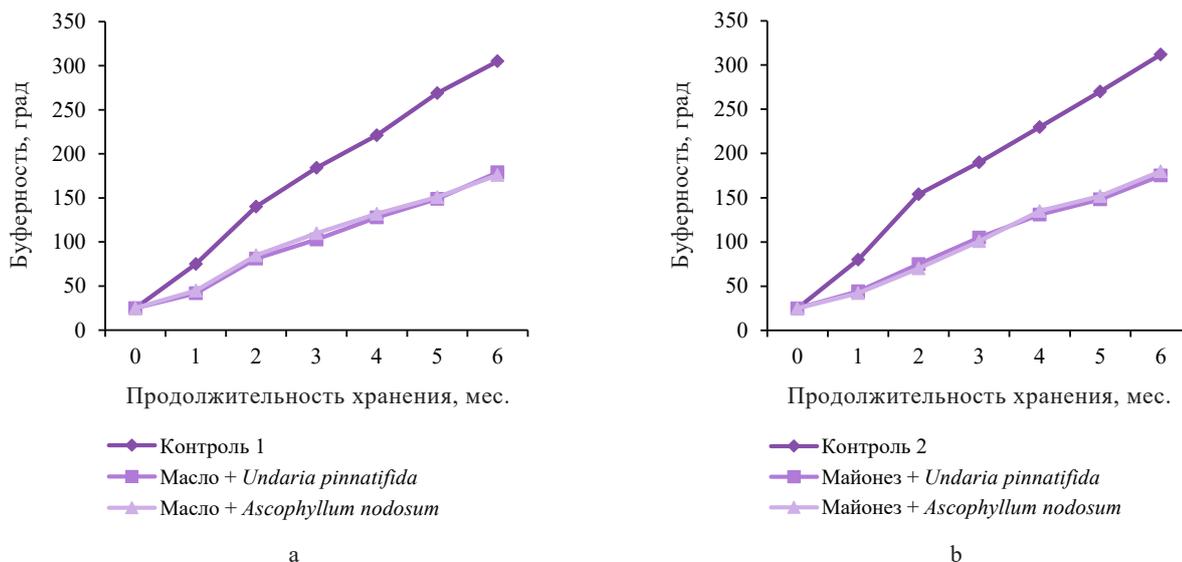


Рисунок 4. Динамика изменения буферности пресервов из сельди тихоокеанской при хранении: а – в масляной заливке, б – в майонезной заливке

Figure 4. Buffer capacity of Pacific herring preserves during storage: a – oil, b – mayonnaise

пресервов из сельди тихоокеанской сверхкритических экстрактов из бурых водорослей процесс нарастания буферности существенно замедлялся, причем сверхкритические экстракты из *U. pinnatifida* и *A. nodosum* проявляли практически одинаковые свойства. Во всех опытных образцах пресервов из тихоокеанской сельди в масляной и майонезной заливках в процессе хранения буферность не превышала предельного значения 180 °С в течение 6 мес. хранения. Полученные дан-

ные позволяют предположить, что введение сверхкритических экстрактов бурых водорослей в заливки для пресервов из сельди тихоокеанской приводит к снижению интенсивности ферментативных изменений в тканях рыбы под действием собственных и микробных ферментов.

Статистическая обработка результатов, полученных путем исследования изменения КМАФАнМ, перекисного и кислотного чисел, а также буферности пресервов

из тихоокеанской сельди в масляной и майонезной заливках в процессе хранения позволила получить уравнения регрессии, представленные в таблице 3.

Коэффициент аппроксимации, характеризующий полученные уравнения, позволяет утверждать об их адекватности и возможности использования для описания исследованных процессов, т. к. составляет не менее 0,97.

Органолептическая оценка качества исследуемых образцов пресервов из тихоокеанской сельди в масляной и майонезной заливках после 4 мес. хранения

проведена с использованием пятибалльной шкалы. Результаты представлены в виде профилограмм на рисунке 5.

Органолептические показатели контрольных образцов продемонстрировали заметные различия после 4 мес. хранения. Из представленных профилограмм видно, что опытные образцы существенно отличались от контрольных по всем исследованным показателям. Сверхкритические экстракты из бурых водорослей *U. pinnatifida* и *A. nodosum* существенно улучшали органолептические показатели пресервов из сельди

Таблица 3. Уравнения регрессии, описывающие динамику изменения КМАФАнМ и буферности пресервов из тихоокеанской сельди в масляной и майонезной заливках в процессе хранения

Table 3. Effect of storage time on QMAFAnM and buffer capacity of Pacific herring preserves in oil and mayonnaise: regression equations

Модельная система	КМАФАнМ		Буферность	
	Уравнение регрессии	Коэффициент аппроксимации	Уравнение регрессии	Коэффициент аппроксимации
Контроль 1	$Y_1 = 0,0024x^2 + 0,6238x + 1,9857$	$R^2 = 0,9929$	$Y_2 = -2,0119x^2 + 62,845x - 37$	$R^2 = 0,9981$
Масло + <i>Ascophyllum nodosum</i>	$Y_1 = 0,0274x^2 + 0,1131x + 2,4429$	$R^2 = 0,9797$	$Y_2 = -1,0238x^2 + 33,619x - 10,571$	$R^2 = 0,9945$
Масло + <i>Undaria pinnatifida</i>	$Y_1 = 0,0452x^2 - 0,0476x + 2,5857$	$R^2 = 0,9792$	$Y_2 = -0,2262x^2 + 27,631x - 5$	$R^2 = 0,9944$
Контроль 2	$Y_1 = 0,0036x^2 + 0,6464x + 1,9857$	$R^2 = 0,9954$	$Y_2 = -2,7024x^2 + 68,655x - 40,429$	$R^2 = 0,9958$
Майонез + <i>Ascophyllum nodosum</i>	$Y_1 = 0,0167x^2 + 0,2595x + 2,3143$	$R^2 = 0,9855$	$Y_2 = -0,4524x^2 + 29,119x - 7$	$R^2 = 0,9959$
Майонез + <i>Undaria pinnatifida</i>	$Y_1 = 0,0214x^2 + 0,2071x + 2,3286$	$R^2 = 0,9766$	$Y_2 = 0,0714x^2 + 26,214x - 5,5714$	$R^2 = 0,9938$

Примечание:  $Y_1$  – КМАФАнМ, КОЕ/г;  $Y_2$  – буферность, град,  $x$  – продолжительность хранения, мес.

Note:  $Y_1$  – QMAFAnM, CFU/g;  $Y_2$  – buffering capacity, degrees;  $x$  – shelf life, months.

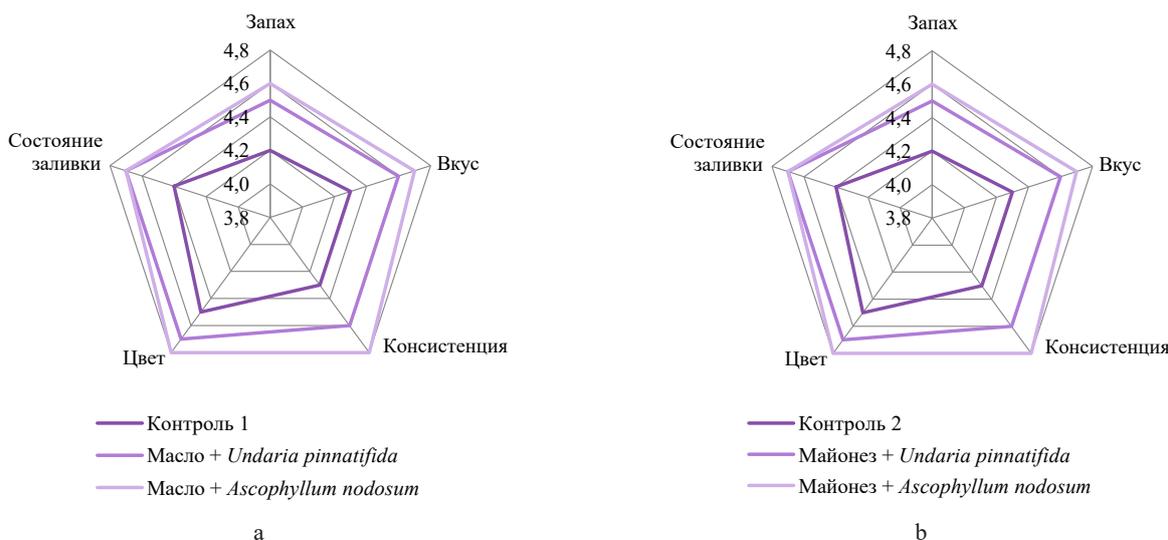


Рисунок 5. Профилограммы органолептической оценки пресервов из сельди тихоокеанской после 4 мес. хранения: а – в масляной заливке, б – в майонезной заливке

Figure 5. Sensory profile of Pacific herring preserves after four months of storage: a – oil, b – mayonnaise

тихоокеанской в масляной и майонезной заливках. Отмечались свойственные данной продукции запах и вкус, отсутствовал привкус и запах окисленного жира. Консистенция опытных образцов пресервов была плотная, сочная, нежная. Наиболее привлекательными явились образцы с сверхкритическими экстрактами *U. pinnatifida*. В контрольных образцах отмечались запах и привкус окисленного жира, прогорклость.

### Выводы

Таким образом, экспериментально доказано, что сверхкритические экстракты морских бурых водорослей *Undaria pinnatifida* и *Ascophyllum nodosum* оказывают определенное влияние на качество и безопасность пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках. Введение сверхкритических экстрактов бурых водорослей *U. pinnatifida* и *A. nodosum* снижает скорость накопления КМАФАнМ, а также микроскопических грибов, замедляет процессы окисления и гидролиза липидного компонента пресервов, тормозит ферментативные процессы в мясе рыбы, что позволяет увеличить срок хранения на 2 мес. по сравнению с контролем. Опытные образцы характеризуются гораздо более низкими значениями перекисного и кислотного чисел в сравнении с контрольными.

Полученные уравнения регрессии, описывающие закономерности изменения КМАФАнМ и буферно-

сти пресервов из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках с сверхкритическими экстрактами морских бурых водорослей *U. pinnatifida* и *A. nodosum*, характеризуются высокими коэффициентами аппроксимации. Пресервы из сельди тихоокеанской в масляной и майонезной заливках с сверхкритическими экстрактами морских бурых водорослей Дальневосточного региона *U. pinnatifida* и *A. nodosum* характеризуются более высокими органолептическими показателями в сравнении с контролем.

### Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что никакого конфликта интересов, связанного с публикацией данной статьи, нет.

### Contribution

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

### References/Список литературы

1. Li X, Zheng S, Wu G. Nutrition and Functions of Amino Acids in Fish. In: Wu G, editor. Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in The Nutrition of Companion, Zoo and Farm Animals. Springer: Cham; 2021. pp. 133–168. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-54462-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-54462-1_8)
2. Chen J, Jayachandran M, Bai W, Xu B. A Critical Review on the Health Benefits of Fish Consumption and its Bioactive Constituents. Food Chemistry. 2022;369:130874. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130874>
3. Dael PV. Role of n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Human Nutrition and Health: Review of Recent Studies and Recommendations. Nutrition Research and Practice. 2021;15(2):137–159. <https://doi.org/10.4162/nrp.2021.15.2.137>
4. Zhang X, Ning X, He X, Sun X, Yu X, Cheng Y, et al. Fatty Acid Composition Analyses of Commercially Important Fish Species from the Pearl River Estuary, China. PLoS One. 2020;15(1):e0228276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228276>
5. Tilami SK, Sampels S. Nutritional Value of Fish: Lipids, Proteins, Vitamins, and Minerals. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture. 2018;26(2):243–253. <https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1399104>
6. Pedro S, Nunes ML. Reducing Salt Levels in Seafood Products. In: Reducing Salt in Foods. Woodhead Publishing; 2019. pp. 185–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100890-4.00008-1>
7. Tavares J, Martins A, Fidalgo LG, Lima V, Amaral RA, Pinto CA, et al. Fresh Fish Degradation and Advances in Preservation Using Physical Emerging Technologies. Foods. 2021;10(4):780. <https://doi.org/10.3390/foods10040780>
8. Hao R, Roy K, Pan J, Shah BR, Mraz J. Critical review on the Use of Essential Oils Against Spoilage in Chilled Stored Fish: A Quantitative Meta-Analysis. Trends in Food Science and Technology. 2021;111:175–190. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.054>
9. Hussain MA, Sumon TA, Mazumder SK, Ali MM, Jang WJ, Abualreesh MH, et al. Essential Oils and Chitosan as Alternatives to Chemical Preservatives for Fish and Fisheries Products. Food Control. 2021;129:108244. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108244>
10. Ekonomou SI, Parlapani FF, Kyritsi M, Hadjichristodoulou C, Boziaris IS. Preservation Status and Microbial Communities of Vacuum-Packed Hot Smoked Rainbow Trout Fillets. Food Microbiology. 2022;103:103959. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103959>

11. Rathod NB, Ranveer RC, Benjakul S, Kim SK, Pagarkar AU, Patange S, et al. Recent Developments of Natural Antimicrobials and Antioxidants on Fish and Fishery Food Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(4):4182–4210. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12787>
12. Hematyar N, Rustad T, Sampels S, Kastrup Dalsgaard T. Relationship Between Lipid And Protein Oxidation in fish. *Aquaculture Research*. 2019;50(5):1393–1403. <https://doi.org/10.1111/are.14012>
13. Bogdanov VD, Blagonravova MV, Saltanova NS. Modern technologies for marinated Pacific herring and salmon. *Petropavlovsk-Kamchatsky: New book*; 2007. 235 p. (In Russ.). [Богданов В. Д., Благонравова М. В., Салтанова Н. С. Современные технологии производства соленой продукции из сельди тихоокеанской и лососевых. Петропавловск-Камчатский: Новая книга, 2007. 235 с.].
14. Bogdanov VD, Karpenko VI, Norinov EG. Aquatic biological resources of Kamchatka: Biology, extraction, and processing. *Petropavlovsk-Kamchatsky*; 2005. 264 p. (In Russ.). [Богданов В. Д., Карпенко В. И., Норинев Е. Г. Водные биологические ресурсы Камчатки: Биология, способы добычи, переработка. Петропавловск-Камчатский, 2005. 264 с.].
15. Saltanova NS. Salting methods for preserves from pre-ripened herring. *Modern science-intensive technologies*. 2010;9:105–106. (In Russ.). [Салтанова Н. С. Обоснование способа посола при производстве пресервов из сельди предварительного созревания // Современные наукоемкие технологии. 2010. № 9. С. 105–106]. <https://elibrary.ru/NAWUHN>
16. Solomko EN. Effect of potassium chloride on chemical and structural-mechanical indicators of herring. *Natural resources: current state, protection, commercial and technical use: Proceedings of the II All-Russian scientific and practical conference*. *Petropavlovsk-Kamchatsky: Kamchatka State Technical University*; 2011. P. 145–147. (In Russ.). [Соломко Е. Н. Исследование влияния хлорида калия на изменение химических и структурно-механических показателей сельди // Природные ресурсы, их современное состояние, охрана, промышленное и техническое использование: Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2011. С. 145–147.].
17. Jagtap AS, Manohar CS, Ayyapanikutty AM, Meena SN. Antioxidant and Antiglycemic Properties of Macroalgae, an Underutilized Blue Economy Bioresource in India. *Russian Journal of Marine Biology*. 2021;47:489–497. <https://doi.org/10.1134/S1063074021060067>
18. Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Colombo I, Ingadottir B, Jonsdottir R, et al. Characterization of Antioxidant Potential of Seaweed Extracts for Enrichment of Convenience Food. *Antioxidants*. 2020;9(3):249. <https://doi.org/10.3390/antiox9030249>
19. Alloyarova YuV, Kolotova DS, Derkach SR. Nutritional and therapeutic potential of functional components of brown seaweed: A review. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(2):398–419. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-616>
20. Fung A, Hamid N, Lu J. Fucoxanthin Content and Antioxidant Properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry*. 2013;136(2):1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.024>
21. Sari AP, Nuridin GM, Manguntungi B, Mustopa AZ. Potential of Red, Brown, and Green Macroalgae from Dato Beach, Majene, Indonesia as Natural Food Preservative. *Philippine Journal of Science*. 2023;152(4):1483–1493.
22. Silva A, Silva SA, Carpena M, Garcia-Oliveira P, Gullón P, Barroso MF, et al. Macroalgae as a Source of Valuable Antimicrobial Compounds: Extraction and Applications. *Antibiotics*. 2020;9(10):642. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100642>
23. Surendhiran D, Li C, Cui H, Lin L. Marine Algae as Efficacious Bioresources Housing Antimicrobial Compounds for Preserving Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2021;358:109416. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109416>
24. Hamad GM, Samy H, Mehany T, Korma SA, Eskander M, Tawfik RG, et al. Utilization of Algae Extracts as Natural Antibacterial and Antioxidants for Controlling Foodborne Bacteria in Meat Products. *Foods*. 2023;12(17):3281. <https://doi.org/10.3390/foods12173281>
25. Silva A, Silva SA, Lourenço-Lopes C, Jimenez-Lopez C, Carpena M, Gullón P, et al. Antibacterial Use of Macroalgae Compounds Against Foodborne Pathogens. *Antibiotics*. 2020;9(10):712. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100712>
26. Hafez MSAE, Rashedy SH, Abdelmotilib NM, El-Hassayeb HEA, Cotas J, et al. Fillet Fish Fortified with Algal Extracts of *Codium Tomentosum* and *Actinotrichia Fragilis*, as a Potential Antibacterial and Antioxidant Food Supplement. *Marine Drugs*. 2022;20(12):785. <https://doi.org/10.3390/md20120785>
27. Miranda JM, Trigo M, Barros-Velázquez J, Aubourg SP. Antimicrobial Activity of Red Alga Flour (*Gelidium* sp.) and its Effect on Quality Retention of *Scomber scombrus* During Refrigerated Storage. *Foods*. 2022;11(7):904. <https://doi.org/10.3390/foods11070904>
28. De Jesus Raposo MF, De Morais AMB, De Morais RMSC. Marine Polysaccharides from algae with Potential Bio-medical Applications. *Marine Drugs*. 2015;13(5):2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
29. El Baz FK, El Baroty GS, Abd El Baky HH, Abd El-Salam OI, Ibrahim EA. Structural characterization and biological activity of Sulfolipids from selected marine algae. *Grasas Y Aceites*. 2013;64(5):561–571.
30. El Shafay SM, Ali SS, El-Sheekh MM. Antimicrobial Activity of Some Seaweed's Species from Red Sea, Against Multidrug Resistant Bacteria. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2016;42(1):65–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.11.006>

31. Kasanah N, Amelia W, Mukminin A, Triyanto, Isnansetyo A. Antibacterial Activity of Indonesian Red Algae *Gracilaria edulis* Against Bacterial Fish Pathogens and Characterization of Active Fractions. *Natural Product Research*. 2019;33(22):3303–3307. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1471079>
32. Anjali KP, Sangeetha BM, Devi G, Raghunathan R, Dutta S. Bioprospecting of Seaweeds (*Ulva lactuca* and *Stoechospermum marginatum*): The compound Characterization and Functional Applications in Medicine-A Comparative Study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;200:111622. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111622>
33. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata, T, Hirayama I, Nakamura T. Bactericidal Activity of Phlorotannins from The Brown Alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;50(6):889–893. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf222>
34. Karpinski TM, Adamczak A. Fucoxanthin—An Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants*. 2019;8(8):239. <https://doi.org/10.3390/antiox8080239>
35. Sosa-Hernández JE, Escobedo-Avellaneda Z, Iqbal HMN, Welti-Chanes J. State-of-the-art Extraction Methodologies for Bioactive Compounds from Algal Biome to Meet Bio-Economy Challenges and Opportunities. *Molecules*. 2018;23(11):2953. <https://doi.org/10.3390/molecules23112953>
36. Gallego R, Bueno M, Herrero M. Sub- and Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Plants, Food-by-Products, Seaweeds and Microalgae—An Update. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019;116:198–213. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.030>
37. Mendiola JA, Santoyo S, Cifuentes A, Reglero G, Ibáñez E, Javier Señoráns F. Antimicrobial Activity of Sub- and Supercritical CO<sub>2</sub> Extracts of The Green Alga *Dunaliella salina*. *Journal of Food Protection*. 2008;71(10):2138–2143. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.10.2138>
38. Saravana PS, Getachew AT, Cho YJ, Choi JH, Park YB, Woo HC, *et al.* Influence of Co-Solvents on Fucoxanthin and Phlorotannin Recovery from Brown Seaweed Using Supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017;120:295–303. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.037>
39. Bogolitsyn KG, Kaplitsin PA, Dobrodeeva LK, Druzhinina AS, Ovchinnikov DV, Parshina AE, *et al.* Fatty Acid Composition and Biological Activity of Supercritical Extracts from Arctic Brown Algae *Fucus vesiculosus*. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2017;11:1144–1152. <https://doi.org/10.1134/S1990793117070065>
40. Tyskiewicz K, Tyskiewicz R, Konkol M, Rójs E, Jaroszuk-Scisel J, Skalicka-Wozniak K. Antifungal Properties of *Fucus vesiculosus* L. Supercritical Fluid Extract Against *Fusarium culmorum* and *Fusarium oxysporum*. *Molecules*. 2019;24(19):3518. <https://doi.org/10.3390/molecules24193518>
41. Sukhovceva MV, Podkorytova AV. Commercial amribe algae and seaweeds of the Far East: biology, distribution, reserves, and processing. Vladivostok: TINRO-center; 2006. 243 p. (In Russ.). [Суховеева М. В., Подкорытова А. В. Промысловые водоросли и травы морей Дальнего Востока: биология, распространение, запасы, технология переработки. Владивосток: ТИНРО-центр, 2006. 243 с.]
42. Dizyurov VD, Kulepanov VN, Shaposhnikova TV. Atlas of algae and seaweeds of the Russian Far East. Vladivostok: Pacific Research Fisheries Center; 2008. 328 p.]. (In Russ.). [Дизюров В. Д., Кулепанов В. Н., Шапошникова Т. В. Атлас массовых видов водорослей и морских трав Дальнего Востока России. Владивосток: Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, 2008. 328 с.]
43. Cassani L, Silva A, Carpena M, Pellegrini MC, García-Pérez P, Grosso C, *et al.* Phytochemical Compounds with Promising Biological Activities from *Ascophyllum nodosum* Extracts Using Microwave-Assisted Extraction. *Food Chemistry*. 2024;438:138037. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138037>
44. Meng W, Sun H, Mu T, Garcia-Vaquero M. Extraction, Purification, Chemical Characterization and Antioxidant Properties *in vitro* of Polyphenols from The Brown Macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Algal Research*. 2023;70:102989. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102989>
45. Gisbert M, Franco D, Sineiro J, Moreira R. Antioxidant and Antidiabetic Properties of Phlorotannin's from *Ascophyllum nodosum* Seaweed Extracts. *Molecules*. 2023;28(13):4937. <https://doi.org/10.3390/molecules28134937>
46. Gan A, Baroutian S. Subcritical Water Extraction for Recovery of Phenolics And Fucoïdan from New Zealand Wakame (*Undaria pinnatifida*) Seaweed. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2022;190:105732. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105732>
47. Park JS, Han JM, Park SW, Kim JW, Choi MS, Lee SM, *et al.* Subcritical Water Extraction of *Undaria pinnatifida*: Comparative Study of the Chemical Properties and Biological Activities Across Different Parts. *Marine Drugs*. 2024;22(8):344. <https://doi.org/10.3390/md22080344>
48. Kim SY, Roy VC, Park JS, Chun BS. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds from Brown Seaweed (*Undaria pinnatifida*) Sporophyll Using Two Sequential Green Extraction Techniques. *Algal Research*. 2024;7:103330. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103330>
49. Tabakaev AV, Tabakaeva OV. Fatty-acid profile of Extracts of The Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2024;60:300–302. <https://doi.org/10.1007/s10600-024-04307-5>; <https://elibrary.ru/TYRMTZ>

50. Tabakaeva OV, Razgonova MP, Tabakaev AV, Kapusta SV, Zinchenko YuN. Qualitative and Quantitative Composition of Carotenoids in Extracts of The Brown Alga *Ascophyllum nodosum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2023;59:999–1001. <https://doi.org/10.1007/s10600-023-04178-2>; <https://elibrary.ru/TMVCUV>
51. Tabakaeva OV, Tabakaev AV. Supercritical Extract from The Japanese Sea Brown Algae *Undaria pinnatifida* as a Source of Bioactive Compounds. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(3):416–424. (In Russ.) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-416-424>; <https://elibrary.ru/JRWASG>
52. Tabakaeva OV, Tabakaev AV. Comparative Characteristics of Carotenoid Profiles and Antiradical Properties of Extracts of Brown Kelp from The Sea of Japan. *Chemistry of Natural Compounds*. 2022;58(2):352–354. <https://doi.org/10.1007/s10600-022-03678-x>; <https://elibrary.ru/DJLKSI>
53. Tabakaeva OV, Tabakaev AV, Silantev VE, Kapusta SV. Antioxidant Properties of Supercritical Extracts of Brown Algae. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(2):253–264. (In Russ.) <https://doi.org/10.21285/achb.922>; <https://elibrary.ru/PXLPLW>
54. Tabakaev AV, Tabakaeva OV. Antioxidant Activity of Brown Algae CO<sub>2</sub> Extracts and Lipid Stability. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2024;54(3):585–597. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-3-2524>
55. Technological instructions for canned and preserved fish. Part 5. Leningrad: Giprorybflot; 1989;213–218. (In Russ.). Сборник технологических инструкций по производству рыбных консервов и пресервов. Часть 5. Л.: Гипрорыбфлот, 1989:213–218.].
56. Safronova TM. Fish and fish products taster's handbook. Moscow: VNIRO; 1998. 244 p. (In Russ.). [Сафронова Т. М. Справочник дегустатора рыбы и рыбной продукции. М.: ВНИРО, 1998. 244 с.].

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2547>  
<https://elibrary.ru/XXMHSY>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Ультразвуковое ускорение отстаивания жира в молоке



В. Г. Блиадзе<sup>1,\*</sup>, В. Ю. Ярышев<sup>1,2</sup>, А. Л. Николаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности<sup>ROR</sup>, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова<sup>ROR</sup>, Москва, Россия

Поступила в редакцию: 23.07.2024

Принята после рецензирования: 17.09.2024

Принята к публикации: 01.10.2024

\*В. Г. Блиадзе: [v\\_bliadze@vniimi.org](mailto:v_bliadze@vniimi.org),

<https://orcid.org/0000-0001-9300-3267>

В. Ю. Ярышев: <https://orcid.org/0009-0007-7848-4606>

А. Л. Николаев: <https://orcid.org/0000-0003-1377-8404>

© В. Г. Блиадзе, В. Ю. Ярышев, А. Л. Николаев, 2024



### Аннотация.

Применение ультразвука высокой частоты (0,4–3 МГц) позволяет осуществить сепарирование молока без использования центробежных сепараторов, что представляет интерес для молочной промышленности. Цель настоящего исследования – подбор характеристик ультразвука и конфигурации излучателей, а также температурного режима озвучивания при сепарировании негомогенизированного пастеризованного молока.

Основной объект исследования – негомогенизированное пастеризованное молоко. Озвучивание молока проводилось аппаратом для ультразвуковой терапии серии УЗТ-1 на частоте 0,88 МГц. Анализ содержания жира во фракциях молока осуществляли с помощью ультразвукового анализатора «Эксперт Профи» (ООО «НПП Лабораторика»).

Исследованы зависимости расслоения молока при температурах 10 и 40 °С от времени воздействия ультразвука с частотой 880 кГц в непрерывном и импульсном режимах. При обеих температурах предложены режимы, позволяющие ускорить расслоение относительно неозвученного образца. При температуре 10 °С и непрерывном озвучивании зависимость градиента жирности между верхней и нижней фракциями молока после расслоения немонотонна. Применение импульсного режима озвучивания (1 мин озвучивания, 1 мин выдержки при заданном количестве таких циклов) позволяет достичь линейной зависимости. Времени озвучивания 10 мин соответствует градиент 4,74 мас.% при выдержке в течение суток в холодильнике. Жирность исходного молока – 3,8 %. При 40 °С происходит расплавление молочного жира, в связи с чем изменяется характер рассматриваемой зависимости: градиент жирности линейно зависит от времени озвучивания, а скорость расслаивания после окончания озвучивания постоянна. Поскольку длительная выдержка молока при повышенной температуре нежелательна, максимальное время расслоения – 1 ч при комнатной температуре. Градиент жирности при этом равен 0,90 мас.% при жирности исходного молока 2,8 %.

Ультразвук частоты 880 кГц способствует ускоренному расслоению негомогенизированного молока. В случае температурного режима 10 °С оптимален импульсный режим, а в случае 40 °С – непрерывное озвучивание.

**Ключевые слова:** Молоко, эмульсия, жирность, ультразвук, сепарирование, коагуляция, стоячая волна

**Для цитирования:** Блиадзе В. Г., Ярышев В. Ю., Николаев А. Л. Ультразвуковое ускорение отстаивания жира в молоке // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 745–755. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2547>

## Ultrasound Acceleration of Milk Fat Separation



Vladimir G. Bliadze<sup>1,\*</sup>, Vladislav Yu. Yaryshev<sup>1,2</sup>,  
Alexander L. Nikolaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Scientific Research Institute of Dairy Industry<sup>ROR</sup>, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University<sup>ROR</sup>, Moscow, Russia

Received: 23.07.2024

Revised: 17.09.2024

Accepted: 01.10.2024

\*Vladimir G. Bliadze: [v\\_bliadze@vniimi.org](mailto:v_bliadze@vniimi.org),

<https://orcid.org/0000-0001-9300-3267>

Vladislav Yu. Yaryshev: <https://orcid.org/0009-0007-7848-4606>

Alexander L. Nikolaev: <https://orcid.org/0000-0003-1377-8404>

©V.G. Bliadze, V.Yu. Yaryshev, A.L. Nikolaev, 2024



### Abstract.

Ultrasonic separation of milk with high-frequency ultrasound (0.4–3 MHz) is a subject of interest for the dairy industry since it separates milk without centrifugal separators. The article introduces the optimal sonication modes for separation of non-homogenized pasteurized milk.

The research featured non-homogenized pasteurized milk sonicated at 0.88 MHz. The fat content analysis involved an Expert Profi ultrasonic analyzer (NPP Laboratorika, LLC).

The experiments focused on the correlation between the milk fractionation and the processing time. The conditions were as follows: 880 kHz at continuous and pulsed sonication at 10 and 40°C. Both temperatures made it possible to accelerate the fractionation process. At 10°C, the fat content gradient between the upper and lower fractions was non-monotonic at continuous sonication. The pulse sonication (1 min sonication, 1 min exposure) made it possible to achieve a linear dependence. Ten minutes of sonication corresponded to a gradient of 4.74 wt.% after 24 h of refrigeration. The fat content of the original milk was 3.8%. Milk fat melted at 40°C, changing the correlation: the dependence of the fat content gradient on the sonication time became linear, and the separation rate was constant after sonication. To minimize the exposure to high temperatures, the longest separation time was 1 h at room temperature. The fat content gradient equaled 0.90 wt.% with the fat content of the original milk being 2.8%.

In this study, sonication with 880 kHz accelerated the separation of homogenized milk. Pulse sonication was optimal at 10°C while continuous sonication was most effective at 40°C.

**Keywords:** Milk, emulsion, fat content, ultrasound, separation, coagulation, standing wave

**For citation:** Bliadze VG, Yaryshev VYu, Nikolaev AL. Ultrasound Acceleration of Milk Fat Separation. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):745–755. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2547>

### Введение

Ультразвук, представляющий собой акустические волны с частотой при диапазоне 20 кГц–10 МГц, находит применение при решении многих промышленных задач [1, 2]. Указанный диапазон частот можно разделить на три поддиапазона: низкочастотный (200–100 кГц), среднечастотный (100 кГц–1 МГц) и высокочастотный (> 1 МГц).

При достижении определенного порогового значения интенсивности ультразвук вызывает в озвучиваемой среде кавитационные эффекты, что проявляется в образовании, росте и последующем схлопывании газовых пузырьков. При коллапсе образующихся пузырьков имеет место локальный нагрев до температур порядка 5000 К и рост давления до нескольких сотен атмосфер [1, 3]. В случае, если озвучиваемая система состоит из несмешивающихся жидкостей, в результате кавитационных эффектов происходит эмульгиро-

вание системы [3–8]. Пороговое значение интенсивности ультразвука, которое приводит к кавитации, зависит как от частоты звуковой волны (возрастает вместе с частотой ультразвука), так и от свойств среды: плотности, поверхностного натяжения, давления паров жидкости, наличия примесных газов.

Низкочастотный ультразвук способствует гомогенизации эмульсий, т. е. уменьшению среднего размера капель дисперсной фазы [8–10] вплоть до получения наноэмульсий [11]. Известны примеры приготовления нанодисперсных суспензий с помощью низкочастотного ультразвука [12]. В пищевой промышленности, в числе прочего, возможно применение ультразвука для размораживания, сушки, стерилизации и экстракции биологически активных веществ из растительного сырья [13, 14]. Было показано [1, 15], что ультразвуковая гомогенизация молока уменьшает средний диаметр капель до 1 мкм. Кроме того, этот метод гомогенизации

позволяет снизить содержание микроорганизмов в гомогенизированном молоке [15–17].

Инактивация микроорганизмов в озвучиваемых системах исследовалась в ряде работ [1, 18, 19]. Как и в случае эмульгирования, основной механизм инактивации – кавитация, вызывающая повреждения клеточных стенок микроорганизмов. Кроме того, возможны и внутриклеточные кавитационные эффекты, повреждающие цепи ДНК и другие составляющие клеток.

Наиболее эффективное обеззараживание молочных продуктов обычно достигается при комбинированном действии нагрева и низкочастотного ультразвука [1]. Даже умеренный нагрев (60 °С) в совокупности с ультразвуковой обработкой на частоте 20 кГц позволяет уменьшить содержание аэробных бактерий в сыром молоке на 5 порядков, а содержание бактерий *Listeria Monocytogenes* в пастеризованном молоке – на 5 порядков [20, 21]. Было показано, что увеличение амплитуды ультразвука повышает его эффективность по отношению к инактивации бактерий *Enterobacteriae* в сыром молоке [22].

В случае, когда волны ультразвука распространяются в противоположных направлениях и конструктивно интерферируют, образуется стоячая волна [8]. Области с максимальным значением какого-либо параметра стоячей волны называются пучностями, а области с минимальным его значением – узлами. Если стоячая волна высокочастотного ультразвука (400 кГц–3 МГц) распространяется в эмульсии или суспензии, то частицы дисперсной фазы концентрируются в пучностях или узлах волны в зависимости от плотностей и сжимаемостей фаз [8, 23–25].

На частицы в поле стоячей ультразвуковой волны действуют силы Бьеркнеса. Первичная сила Бьеркнеса (сила акустического давления)  $F_{ac}$  на сферическую частицу радиуса  $R$  в поле стоячей ультразвуковой волны длины  $\lambda$ ,  $R \ll \lambda$ , задается выражением (1):

$$F_{ac} = -\frac{8\pi^2}{3\lambda} R^3 E_{ac} \Phi \sin\left(\frac{4\pi}{\lambda} x\right) \quad (1)$$

где  $E_{ac}$  – средняя плотность акустической энергии,  $x$  – расстояние от узла стоячей волны,  $\Phi$  – фактор акустического контраста, который определяется в соответствии с выражением [8, 23, 24] (2):

$$\Phi = \frac{5\rho_p - 2\rho_m}{2\rho_p + \rho_m} - \frac{\beta_p}{\beta_m} \quad (2)$$

где  $\rho_m, \rho_p$  – плотности дисперсионной среды и дисперсной фазы;  $\beta_m, \beta_p$  – сжимаемость дисперсионной среды и дисперсной фазы. При  $\Phi < 0$  частицы дисперсной фазы смещаются к пучностям стоячей волны, тогда как при  $\Phi > 0$  – к узлам.

Оценить сжимаемость частиц дисперсной фазы можно в соответствии с выражением (3):

$$\beta_p = \frac{1}{\rho_p c^2} \quad (3)$$

где  $c$  – скорость распространения звуковой волны в дисперсионной среде.

Вторичная сила Бьеркнеса описывает взаимодействие частицы с волнами, рассеянными на соседних частицах, и приводит к флокуляции и коалесценции частиц [24, 26]. Вторичная сила Бьеркнеса быстро убывает с ростом расстояния между частицами, поэтому применима только в случае концентрирования частиц в пучностях или узлах волны. Обычно вторичная сила на 1–2 порядка меньше, чем первичная [8].

Роль концентрирования частиц дисперсной фазы в узлах или пучностях волны заключается в упрощении их коалесценции или коагуляции, в результате чего имеет место увеличение размера частиц. Согласно закону Стокса, скорость оседания или всплытия частиц дисперсной фазы пропорциональна квадрату их радиуса:

$$v = \frac{2r^2(\rho_p - \rho_m)g}{9\eta} \quad (4)$$

где  $r$  – радиус частиц,  $g$  – ускорение свободного падения,  $\eta$  – вязкость дисперсионной среды. Закон Стокса справедлив в случае жидкой дисперсной фазы.

Применимость высокочастотного ультразвука для сепарирования различных систем продемонстрирована в ряде работ. Красные кровяные тельца могут быть отделены от плазмы крови ультразвуковым методом [27, 28]. Разделение водных суспензий с различными твердыми фазами может применяться при очистке воды от взвешенных примесей [25, 26]. Применительно к задачам пищевой промышленности ультразвук высокой частоты позволяет разрушать водные эмульсии рапсового масла и сепарировать молоко на фракцию сливок и обезжиренное молоко [25, 29–31].

В настоящее время промышленное сепарирование молока осуществляется с помощью сепараторов, действие которых основано на центробежной силе, и основано на различии плотностей фракций [30].

Ультразвуковое сепарирование молока позволяет добиться «мягкого» разделения фракций, при котором нарушение целостности жировых капель молочной эмульсии минимизировано [26]. Сопутствующее образование свободных радикалов под действием ультразвука не влияет на целостность капель и потребительские качества молока [30].

Ультразвуковое сепарирование дает возможность ускорять отстаивание жира в молоке-сырье, что может положительно сказаться на технологическом процессе сыродельных предприятий. Соотношение массовых долей казеина и жира в молоке, используемом для приготовления сыра с содержанием жира в сухом веществе 48–53 %, должно находиться в определенных пределах – от 0,67 до 0,72, или, соответственно, соотношение массовых долей общего белка и жира – в интервале от 0,90 до 0,96 [32, 33]. В сыром коровьем молоке соотношение массовых долей белка и жира находится в интервале от 0,8 до 0,9, т. е. смесь незначительно пере-

обогащена по жиру и нуждается в нормализации, которую можно осуществить или снятием излишка жира, или обогащением по белку. В связи с этим ультразвуковое сепарирование молока до требуемых значений может быть востребовано на сыродельных предприятиях и позволит отказаться от не всегда приемлемого варианта использования центрифужных сепараторов.

Было показано, что для наиболее эффективного сепарирования эмульсий масло-вода необходим прямой контакт излучателя с эмульсией [24]. Применимость ультразвука частоты 400 кГц и 1,6 МГц к сепарированию сырого молока продемонстрирована как на малых (7 мл), так и на средних (6 л) объемах [26, 31]. Оказалось, что сепарирование сырого молока при частоте ультразвука 1,6 МГц более эффективно, чем при 400 кГц. Ультразвук с частотой 1 и 2 МГц оказался эффективен при сепарировании сырого молока [30, 34]. Показано, что с ростом температуры озвучиваемого молока от 5 до 40 °С эффективность сепарирования

возрастает, что связано с увеличением абсолютной величины фактора акустического контраста (формула 2).

Если при 5 °С ультразвук с частотой 1 МГц при озвучивании в течение 5 мин и мощности ультразвука 343 Вт вызывает убыль концентрации жира в объеме молока с 3,58 до 3,56 %, то при 40 °С концентрация жира падает с 3,4 до 2,9 % [30]. Установка, используемая в описанном эксперименте, приведена на рисунке 1. Объем озвучиваемого молока составлял 1,1 л. Исследовалась частота ультразвука 600 кГц при мощности 700 Вт, которая показала меньшую эффективность при сепарировании при температурах 25 и 40 °С, однако при охлаждении озвучиваемого молока до 5 °С, напротив, сепарирование происходило только при ультразвуке частотой 600 кГц (в объеме молока содержание жира убывало с 3,4 до 3,3 %).

Для демонстрации наличия коалесценции и коагуляции при озвучивании измеряли средневзвешенный диаметр капель эмульсии сначала в контрольной пробе, а затем в верхнем и нижнем слоях молока после озвучивания. Исходно измеренные величины средневзвешенного диаметра составили 4,4, 4,5 и 4,3 мкм для молока при температурах 5, 25 и 40 °С. Озвучивание при 5 °С и 600 кГц позволило добиться изменения этой величины до 4,36 и 4,70 мкм для верхней и нижней частей пробы соответственно. Наиболее эффективного разделения удалось добиться при озвучивании молока ультразвуком с частотой 1 МГц при 25 °С: средневзвешенный диаметр изменился с 4,5 мкм до 4,0 и 4,9 мкм в верхней и нижней частях пробы соответственно. Таким образом, имеет место коалесценция и последующая седиментация капель молочного жира [30].

Исследовалось сепарирование молока литровых масштабов на частотах 400 кГц и 2 МГц [31]. С учетом того, что сепарирование сильно зависит от расположения и количества излучателей и отражателей, был предложен ряд схем акустической ячейки (рис. 2).

Размеры пластин излучателей – 100×100 мм, энергия, выдаваемая излучателем, составила 620 Вт

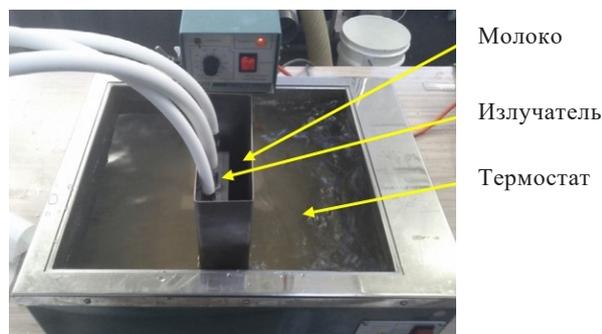


Рисунок 1. Установка, использованная в работе при ультразвуковом сепарировании молока [30]. Реализована горизонтальная конфигурация излучателя, озвучивание осуществляется по всей площади боковой стенки емкости с молоком

Figure 1. Experimental ultrasonic separation setup [30]: horizontal emitter, side wall sonication.

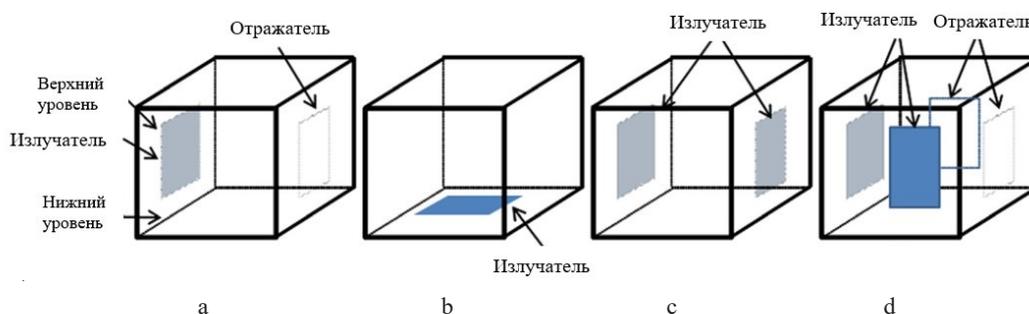


Рисунок 2. Акустические ячейки, предложенные для сепарирования молока в работе [28]: а – один горизонтальный излучатель, б – вертикальный излучатель, с – пара параллельных горизонтальных излучателей, д – пара перпендикулярных горизонтальных излучателей

Figure 2. Acoustic cells for milk separation [28]: a – one horizontal radiator; b – vertical radiator; c – paired parallel horizontal radiators; d – paired perpendicular horizontal radiators

(18,6 кДж/кг). Объем молока в ячейке – 1 л. В случае использования одного излучателя в вертикальной геометрии (рис. 2b) наиболее эффективное сепарирование обеспечивает ультразвук с частотой 400 кГц. Тем не менее при переходе к горизонтальной геометрии (рис. 2a) только ультразвук с частотой 2 МГц позволяет добиться значимого прироста скорости сепарирования по сравнению с контрольным образцом.

Использование двух излучателей оказалось малоэффективным как для частоты 400 кГц, так и для 2 МГц. Схема с перпендикулярными излучателями (рис. 2d) на частоте 400 кГц привела к результату, аналогичному схеме b на той же частоте ультразвука. Излучатели действуют несинхронно, что не позволяет эффективно увеличить амплитуду стоячей волны, и, как следствие, не ускоряет сепарирование.

В случае с ультразвуковой частотой 2 МГц основное влияние на сепарирование оказывает формирование потоковых эффектов в озвучиваемой среде, приводящее к коалесценции частиц [35]. Однако эффективность потоковых эффектов значительно ниже, чем укрупнение частиц под действием сил Бьеркнеса. Таким образом, ультразвук с частотой 2 МГц оказывается эффективным только в горизонтальной геометрии (рис. 2a).

Во всех описанных экспериментах отсутствует ток молока через озвучиваемую ячейку. Тем не менее интерес представляет именно проточный эксперимент, поскольку он может увеличить производительность сепарирования.

Цель настоящего исследования – разработка подходов к оптимизации параметров излучения, конфигурации излучателей и температурного режима при ультразвуковом сепарировании негомогенизированного пастеризованного молока.

### Объекты и методы исследования

Основной объект исследования – молоко пастеризованное негомогенизированное (ООО «Итальянские традиции», г. Москва). В качестве консерванта к молоку добавляли азид натрия квалификации «ч».

Кроме того, проводились исследования влияния ультразвука на эмульсии дистиллированной воды с толуолом различного состава, стабилизированные эмульгаторами. Для приготовления эмульсий использовали толуол квалификации «ч.д.а.», в качестве эмульгатора применяли ПАВ Steareth-21 (ГЛБ 15.4).

**Оборудование и процедура исследования.** Для взвешивания всех образцов использовали аналитические весы Shimadzu AX200 (Япония, точность 0,0002 г) или весы OWA Labor Nagema (ГДР, точность 0,1 г).

**Эмульсия вода-толуол.** Приготовление эмульсий дистиллированная вода-толуол осуществляли следующим образом: известные массы воды и толуола добавляли в химический стакан объемом 50 мл, затем эмульгировали ультразвуком низкой частоты (генератор УЗГ-3, частота ультразвука 44 кГц) в течение 1 мин.

Затем полученную эмульсию разделяли на 2 равные части и переливали в стеклянные кюветы (внешние размеры 55×24×46 мм). Одна из кювет использовалась в качестве контрольной, а в другой кювете озвучивали эмульсию высокочастотным ультразвуком (аппараты УЗТ-1, частота ультразвука 0,88 или 2,64 МГц, интенсивность 1 Вт/см<sup>2</sup>, рабочая часть излучателя – круг диаметром 1 см) в течение заданного промежутка времени. При озвучивании производилось термостатирование водой комнатной температуры (23 ± 1 °С). Контроль за расслоением эмульсии осуществляли путем измерения высоты толуольной фазы.

При озвучивании эмульсии в описанной ячейке излучатель располагали вплотную к одной из граней кюветы так, чтобы звуковая волна распространялась вдоль ее длинной стороны. Схема ячейки приведена на рисунке 3.

Помимо описанной ячейки с горизонтальным распространением волны, использовали ячейку с вертикальной конфигурацией излучателя (рис. 4). В данном случае рабочий объем эмульсии составляет 50 мл, а термостатирование осуществляется с помощью перистальтического насоса Eлpaп 372.С (Польша) при прокачивании воды заданной температуры через внешний контур ячейки. Интенсивность ультразвука, как и ранее, составляет 1 Вт/см<sup>2</sup>.

**Молоко.** Негомомогенизированное молоко консервировали путем добавления сухого азидата натрия до концентрации 0,4 г/л. Затем молоко хранили при температуре 4 °С. Перед каждым экспериментом молоко перемешивали.

Озвучивание молока ультразвуком высокой частоты осуществлялось в ячейке, конфигурация которой изображена на рисунке 4. 250 мл молока нагревали до температуры эксперимента, затем мерным цилиндром отмеряли 50 мл и вносили в термостатируемую ячейку для озвучивания. Озвучивание проводилось в двух температурных режимах: 10 и 40 °С (аппарат УЗТ-1, частота ультразвука 0,88 МГц, интенсивность 1 Вт/см<sup>2</sup>, рабочая часть излучателя – круг диаметром 1 см).

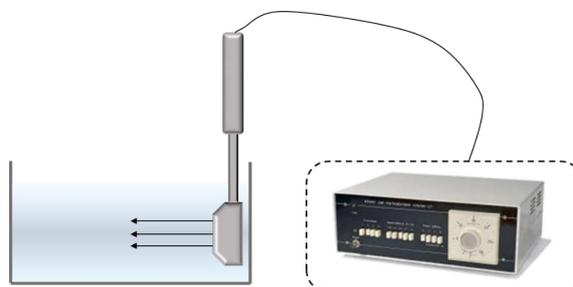


Рисунок 3. Схема горизонтальной ячейки, используемой в настоящей работе.

Направление распространения ультразвуковых волн показано стрелками

Figure 3. Horizontal cells with wave lines indicated by arrows

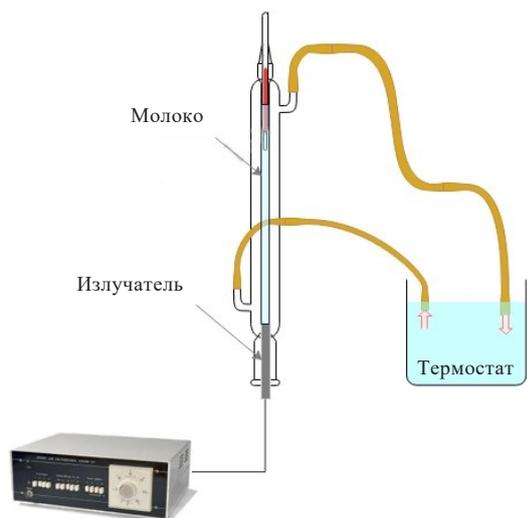


Рисунок 4. Схема вертикальной ячейки, используемой в настоящей работе. Термостатируемая жидкость (вода) циркулирует по системе с помощью перистальтического насоса

Figure 4. Vertical cells with a peristaltic pump for water

Озвучивание молока в статической ячейке осуществляли в течение 5 и 10 мин при заданной температуре. Затем молоко переносили в делительную воронку объемом 100 мл и выдерживали заданное время для расслоения.

При температуре озвучивания 10 °С время выдержки составляло 30 мин при комнатной температуре (23 ± 1 °С) или 24 ч в холодильнике (4 °С).

В случае озвучивания при 40 °С выдержка осуществлялась при комнатной температуре в течение 15, 30 и 60 мин.

По окончании выдержки разделяли молоко на две фракции в массовом соотношении 1:1 с помощью делительной воронки, сливая фракции в заранее взвешенные центрифужные пробирки объемом 50 мл, контролируя объем фракции по нанесенным на пробирку делениям. Затем пробирки взвешивали и фиксировали массу фракций молока.

Полученные фракции перемешивали и анализировали на содержание жира с помощью ультразвукового анализатора молока "Эксперт-Профи" (ООО НПП «Лабораторика»). Для каждого анализа отбирали по 2 независимые пробы объемом 5 мл: первую использовали для промывания анализатора, а вторую – непосредственно для анализа. Проводили 3 измерения жирности, результаты усредняли.

Проводили озвучивание в импульсном режиме при температуре 10 °С в течение 1 мин, затем отстаивание без озвучивания в течение 1 мин. Режим подбирали таким образом, чтобы общее время озвучивания составляло 5 и 10 мин. Полученные образцы выдерживали 30 мин или 24 ч и разделяли с помощью делительной воронки, как описано выше.

**Анализ данных.** Обработку полученных данных выполняли в программных средах Microsoft Office Excel 2016 и OriginPro 2018.

### Результаты и их обсуждение

**Эмульсия вода-толуол.** При работе с эмульсией вода-толуол основной целью стал подбор частоты ультразвука, которая обеспечивает наиболее эффективную коалесценцию капель эмульсии и, как следствие, наиболее быстрое ее расслоение. Состав эмульсии: 10 мас.% толуол, 90 мас.% дистиллированной воды. Наиболее эффективную стабилизацию эмульсии обеспечивает ПАВ Steareth-21 (ГЛБ 15.4), что коррелирует с известными данными [36].

При концентрации эмульгатора 0,0025 масс. % время расслоения данной системы при комнатной температуре в ячейке, показанной на рисунке 1, составляет 180–200 мин. Озвучивание ультразвуком с частотой 2,64 МГц при интенсивности 1 Вт/см<sup>2</sup> даже в течение 20 мин не приводит к значимому ускорению расслаивания эмульсии, что, по-видимому, связано с ключевым ограничением ( $R \ll \lambda$ ) первичной силы Бьеркнеса.

При этом ультразвук с частотой 0,88 МГц и той же интенсивности обеспечивает полное расслоение эмульсии в течение 20 мин озвучивания. Кроме того, можно наблюдать локальные уплотнения толуольной фазы, соответствующие пучностям стоячей волны. Таким образом, эффективность ультразвука с частотой 0,88 МГц для коалесценции жировых капель превышает таковую для частоты 2,64 МГц.

В случае вертикальной ячейки, изображенной на рисунке 6, при частоте 0,88 МГц можно наблюдать структурирование эмульсии и образование уплотнений толуольной фазы в пучностях стоячей волны.

**Молоко. Температура 10 °С.** При температуре 10 °С молочный жир находится в твердом агрегатном состоянии, в связи с чем основной механизм укрупнения частиц дисперсной фазы – коагуляционный, сопровождающийся образованием разветвленных коагулятов.

Результаты, полученные при разделении фракций молока с использованием делительной воронки и сравнении непрерывного режима с импульсным, приведены в таблице 1.

Сравнение градиента жирности между импульсным и непрерывным режимом приведено на рисунке 5.

Из рисунка 5 видно, что в случае непрерывного озвучивания при температуре 10 °С градиент жирности превосходит контрольный показатель (точка 0 мин). Однако в случаях быстрого (30 мин) и медленного (24 ч) расслаивания эффективность 5-минутного озвучивания превосходит эффективность 10-минутного. Это может быть связано, в частности, с разбиением жировых коагулятов при длительном озвучивании.

По этой причине в качестве альтернативы непрерывному озвучиванию был предложен импульсный режим – чередование озвучивания и отстаивания по 1 мин. Из рисунка 5 следует, что импульсный режим

Таблица 1. Жирность фракций молока, предварительно озвученного при температуре 10 °С в статической ячейке: (жирность исходного молока – 3,8 %)

Table 1. Fat content in fractions, preliminarily identified at 10 °C in a static milk cell: continuous vs. pulse sonication with 3.8% original fat content

Время выдержки	Время озвучивания, мин	Режим	Содержание жира, мас.%		Градиент содержания жира, мас.%
			Нижняя фракция	Верхняя фракция	
30 мин	0	Непрерывный	3,77	3,90	0,13
	5		3,68	3,99	0,32
	10		3,77	4,03	0,26
	0	Импульсный	3,79	3,91	0,12
	5		3,84	4,07	0,23
	10		3,71	4,07	0,36
24 ч	0	Непрерывный	1,76	5,44	3,68
	5		1,28	6,22	4,94
	10		1,51	6,10	4,59
	0	Импульсный	1,76	5,44	3,68
	5		1,54	5,98	4,44
	10		1,44	6,14	4,70

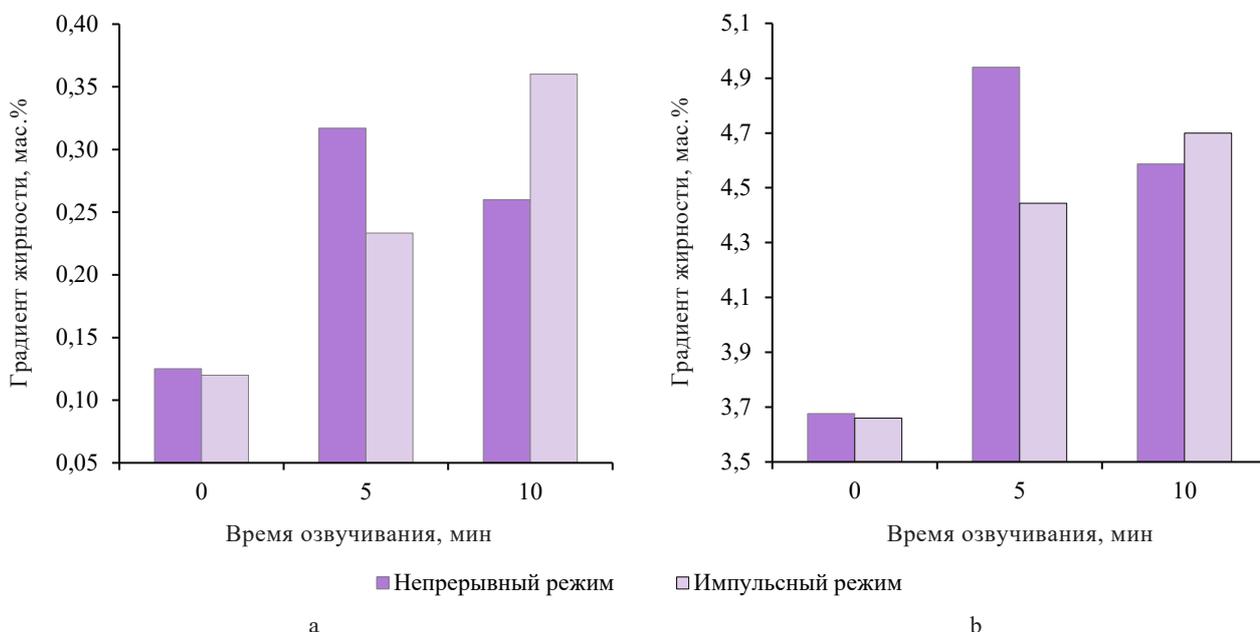


Рисунок 5. Градиент жирности при озвучивании при температуре 10 °С в непрерывном и импульсном режимах при расщеплении в течение 30 мин (а) и 24 ч (б)

Figure 5. Fat gradient during continuous vs. pulse sonication; 30 min (a) and 24 h (b) of fractionation, 10 °C; non-sonicated control – 0 min of sonication

изменяет характер зависимости градиента жирности от времени озвучивания: теперь градиент в точке 10 мин превосходит таковой для точки 5 мин, и зависимость становится монотонной.

**Температура 40 °С.** При температуре 40 °С жир в жировых шариках в молоке изменяет агрегатное состояние, становясь полностью жидким. По этой причине можно ожидать изменения режима укрупнения капель с коагуляции (образование разветвленных жировых агрегатов) на коалесценцию (укрупнение капель).

Результаты определения жирности фракций молока, разделенных после озвучивания при 40 °С, приведены в таблице 2.

На рисунке 6 приведена диаграмма, демонстрирующая зависимость градиента жирности при озвучивании при 40 °С от времени расщепления.

Имеет место устойчивый тренд на возрастание градиента жирности с ростом времени озвучивания.

На рисунке 7 приведена зависимость градиента жирности от времени отстаивания молока после озву-

Таблица 2. Жирность фракций молока, полученных при озвучивании при температуре 40 °С (жирность исходного молока – 2,8 %)

Table 2. Fat content in fractions obtained by sonication at 40 °C with 2.8% original fat content.

Время выдержки, мин	Время озвучивания, мин	Содержание жира, мас. %		Градиент содержания жира, мас. %
		Нижняя фракция	Верхняя фракция	
15	0	2,77	2,86	0,09
	5	2,73	2,88	0,15
	10	2,73	2,95	0,22
30	0	2,55	2,85	0,30
	5	2,57	2,95	0,38
	10	2,49	3,11	0,62
60	0	2,48	3,07	0,59
	5	2,47	3,24	0,77
	10	2,43	3,32	0,90

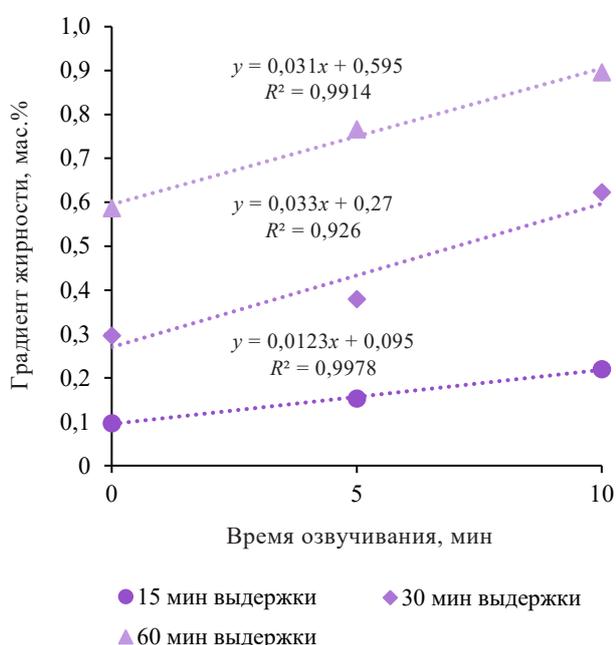


Рисунок 6. Зависимость градиента жирности от времени озвучивания. Температура озвучивания 40 °С (жирность исходного молока – 2,8 %)

Figure 6. Effect of sonication time on fat gradient; 40 °C, 2.8% original fat content; exposure time

чивания. Линейная аппроксимация этих зависимостей позволяет определить скорость расслаивания при озвучивании в течение различного времени.

На рисунке 8 приведена зависимость скорости расслаивания (скорость роста градиента жирности) от времени озвучивания при температуре 40 °С. Ультразвуковое воздействие в течение 5 мин позволяет ускорить расслаивание на 30 %, а в течение 10 мин – на 66 % относительно неозвученного образца. Оказывается, что данная зависимость линейна с высоким коэффициентом корреляции.

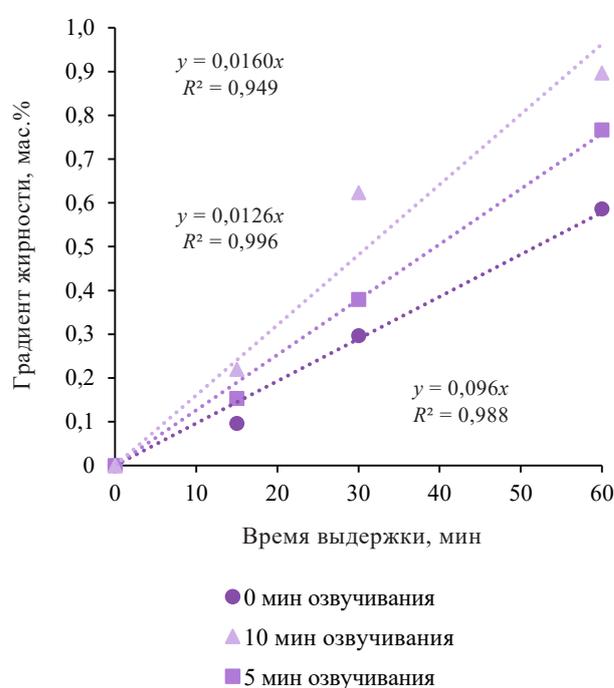


Рисунок 7. Расслаивание молока при отстаивании после озвучивания при 40 °С

Figure 7. Milk fractionation during settling after sonication at 40 °C

Таким образом, в случае озвучивания при 10 °С оптимальным является импульсный режим, а в случае 40 °С – непрерывный.

Попытки применить указанные методы к ультрапастеризованному гомогенизованному молоку (Parmalat, массовая доля жира 3,8 %) результатов не принесли: расслоения не наблюдается, что, по-видимому, связано с уменьшением силы Бьеркнеса (формула 1) из-за минимизации градиента плотностей дисперсионной среды, дисперсной фазы и, соответственно, фактора акустического контраста, а также

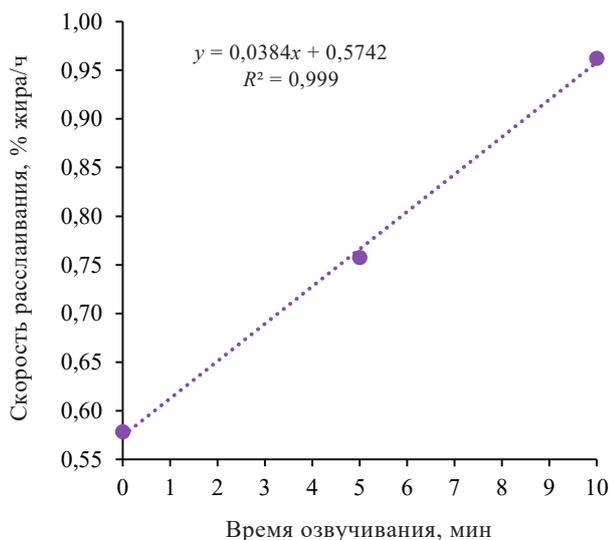


Рисунок 8. Зависимость скорости расслаивания от времени озвучивания при температуре 40 °С.

Figure 8. Effect of sonication time on fractionation rate at 40 °C

критической зависимости этой силы от радиуса частиц в третьей степени.

### Выводы

Исследовали влияние ультразвука высокой частоты (0,88 МГц) на негомогенизированное пастеризованное молоко. Основным контролируемым параметром – градиент жирности между фракциями, полученными при расслаивании анализируемой пробы молока.

Полученные результаты позволяют утверждать, что при температурах озвучивания 10 и 40 °С возможно подобрать режим озвучивания и конфигурацию оборудования, при котором расслаивание озвученного молока будет происходить быстрее, чем контрольного.

При температуре молока 10 °С наиболее оптимальным режимом с точки зрения достижения максимального градиента жирности является импульсный, т. е. чередование стадий озвучивания и отстаивания молока, длительность каждой из стадий – 1 мин. Таким образом удается достичь градиента жирности 0,36 масс.% при расслоении в течение 30 мин при комнатной температуре или 4,74 масс.% при расслоении в течение суток в холодильнике (4 °С).

Непрерывное озвучивание при 10 °С приводит к немонотонному росту градиента жирности в зависимости от времени эксперимента, что может быть связано с разбиванием жировых коагулятов при длительном озвучивании.

При температуре 40 °С нет необходимости применять импульсный режим, поскольку в этом случае зависимость градиента жирности от времени озвучивания линейна, что может быть связано с изменением режима укрупнения жировых частиц с коагуляции на коалесценцию.

Кроме того, зависимость градиента от времени выдержки (времени расслоения) также линейна, т. е. скорость этого процесса постоянна в исследуемом интервале времени выдержки (от 15 мин до 1 ч при комнатной температуре).

Таким образом, наиболее эффективного расслоения фракций молока следует ожидать при температуре 40 °С при продолжительности озвучивания не менее 10 мин. Однако при 10 °С хороших результатов позволяет добиться применение импульсного режима озвучивания.

### Критерии авторства

В. Г. Блиадзе – концепция и методология исследования, руководство работой, обсуждение полученных результатов. В. Ю. Ярышев – выполнение экспериментов, написание и редактирование рукописи, обработка данных. А. Л. Николаев – научное консультирование, обсуждение результатов, формулировка выводов.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Contribution

V.G. Bliadze developed the research concept and methodology, supervised the research, and formulated the results. V.Yu. Yaryshev conducted the experiments, wrote the manuscript, and processed the data. A.L. Nikolaev provided scientific consulting and formulated the conclusions.

### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

### References/Список литературы

1. Chandrapala J, Leong T. Ultrasonic Processing for Dairy Applications: Recent Advances. *Food Engineering Reviews*. 2015;7:143–158. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9105-8>
2. Ashokkumar M, Mason TJ. Sonochemistry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2004. <https://doi.org/10.1002/0471238961.1915141519211912.a01.pub2>
3. Thi Hong Bui A, Cozzolino D, Zisu B, Chandrapala J. Effects of high and low frequency ultrasound on the production of volatile compounds in milk and milk products – a review. *Journal of Dairy Research*. 2020; 87(4):501–512. <https://doi.org/10.1017/s0022029920001107>

4. Mason TJ, Lorimer JP. *Sonochemistry, Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry*. Ellis Horwood, New York. 1989.
5. Freitas S, Hielscher G, Merkle HP, Gander B. Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification—a useful tool for pharmaceutical development and production. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2006; 13(1):76–85. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.10.004>
6. Abismail B, Conselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasound: droplet size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1999;6(1-2):75–83. [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(98\)00027-3](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(98)00027-3)
7. Abismai B, Conselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification processes: on-line study by multiple light scattering measurements. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2000;7(4):187–192. [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(00\)00040-7](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(00)00040-7)
8. Leong T, Johansson L, Juliano P, McArthur SL, Manasseh R. Ultrasonic Separation of Particulate Fluids in Small- and Large-Scale Systems: A Review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2013;52(47):16555–16576. <https://doi.org/10.1021/ie402295r>
9. Al-Hilphy ARS, Niamah AK, Al-Temimi AB. Effect of ultrasonic treatment on buffalo milk homogenization and numbers of bacteria. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*. 2012;2(6):113–118. <https://doi.org/10.5923/j.food.20120206.03>
10. Koh LLA, Chandrapala J, Zisu B, Martin GJO, Kentish SE, Ashokkumar M. A comparison of the effectiveness of sonication, high shear mixing and homogenization on improving the heat stability of whey proteins solutions. *Food and Bioprocess Technology*. 2014;7:556–566. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1072-1>
11. Prasad J, Dixit A, Sharma SP, Mwakosya AW, Petkoska AT, Upadhyay A, et al. Nanoemulsion-based active packaging for food products. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(1):22–36. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-1-585>
12. Gmoshinski IV, Ananyan MA, Shipelin VA, Riger NA, Trushina EN, Mustafina OK, et al. Effect of dihydroquercetin on the toxic properties of nickel nanoparticles. *Foods and Raw Materials*. 2023;11(2):232–242. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-2-572>
13. Burak LCh, Zavaley AP. Combined Ultrasound and Microwave Food Processing: Efficiency Review. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2024;54(2):342–357. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2510>
14. Kozlova OV, Velichkovich NS, Fashkutdinova ER, Neverova OA, Petrov AN. Methods for Extracting Immune-Response Modulating Agents of Plant Origin. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(4):680–688. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2468>
15. Zverev SV, Lobanov AV. Ultrasound technology in the dairy industry. *Milk Processing*. 2005;(1):10. (In Russ.). [Зверев С. В., Лобанов А. В. Ультразвуковая техника в молочной промышленности // Переработка молока. 2005. № 1. С. 10.]. <https://elibrary.ru/UZDYXT>
16. Berezovskii YuM, Dergachev PP, Bliadze VG. Possibilities of milk ultrasonic treatment. *Dairy Industry*. 2009;(5): 46–47. (In Russ.). [Березовский Ю. М., Дергачев П. П., Блиадзе В. Г. Возможности ультразвуковой обработки молока // Молочная промышленность. 2005. № 5. С. 46–47.]. <https://elibrary.ru/KZQKTJ>
17. Kanina KA, Krasulya ON, Zhizhin NA., Semenova ES. Study of the effect of high-frequency acoustic cavitation on the quality of raw milk and dairy products based on it. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2019;81(3):145–150. (In Russ.). <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2019-3-145-150>; <https://www.elibrary.ru/ORQIKV>
18. Hughes DE, Nyborg WL. Cell Disruption by Ultrasound. *Science*. 1962;138(3537):108–114. <https://doi.org/10.1126/science.138.3537.108>
19. Bermúdez-Aguirre D, Mobbs T, Barbosa-Cánovas GV. *Ultrasound Applications in Food Processing*. In: Feng H, Barbosa-Canovas G, Weiss J, editors. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. New York: Springer; 2010. pp. 65–105. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3_3)
20. D’Amico DJ, Silk TM, Wu J, Guo M. Inactivation of Microorganisms in Milk and Apple Cider Treated with Ultrasound. *Journal of Food Protection*. 2006;69(3):556–563. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.3.556>
21. Gera N, Doores S. Kinetics and Mechanism of Bacterial Inactivation by Ultrasound Waves and Sonoprotective Effect of Milk Components. *Journal of Food Science*. 2011;76(2):M111–M119. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02007.x>
22. Juraga E, Šalamon B, Herceg Z, Režek J. Application of high intensity ultrasound treatment on Enterobacteriae count in milk. *Mljekarstvo*. 2011;61(2):125–134.
23. Tolt TL, Feke DL. Separation of dispersed phases from liquids in acoustically driven chambers. *Chemical Engineering Science*. 1993;48(3):527–540. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(93\)80307-c](https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80307-c)
24. Johnson DA, Feke DL. Methodology for fractionating suspended particles using ultrasonic standing wave and divided flow fields. *Separations Technology*. 1995;5(4):251–258. [https://doi.org/10.1016/0956-9618\(95\)00130-1](https://doi.org/10.1016/0956-9618(95)00130-1)
25. Benes E, Groschl M, Nowotny H, Trampler F, Keijzer T, Bohm H, et al. Ultrasonic separation of suspended particles. 2001 IEEE Ultrasonics Symposium. Proceedings. An International Symposium. 2001;1:649 – 659. <https://doi.org/10.1109/ULTSYM.2001.991812>

26. Juliano P, Kutter A, Cheng LJ, Swiergon P, Mawson R, Augustin MA. Enhanced creaming of milk fat globules in milk emulsions by the application of ultrasound and detection by means of optical methods. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011;18(5):963–973. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.03.003>
27. Kapishnikov S, Kantsler V, Steinberg V. Continuous particle size separation and size sorting using ultrasound in a microchannel. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*. 2006;01:P01012. <https://doi.org/10.1088/1742-5468/2006/01/p01012>
28. Petersson F, Nilsson A, Holm C, Jönsson H, Laurell T. Separation of lipids from blood utilizing ultrasonic standing waves in microfluidic channels. *The Analyst*. 2004;129(10):938–943. <https://doi.org/10.1039/b409139f>
29. Nii S, Kikumoto S, Tokuyama H. Quantitative approach to ultrasonic emulsion separation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009;16(1):145–149. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.07.005>
30. Leong T, Juliano P, Johansson L, Mawson R, McArthur SL, Manasseh R. Temperature effects on the ultrasonic separation of fat from natural whole milk. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014;21(6):2092–2098. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.02.003>
31. Juliano P, Temmel S, Rou M, Swiergon P, Mawson R, Knoerzer K. Creaming enhancement in a liter scale ultrasonic reactor at selected transducer configurations and frequencies. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20(1):52–62. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.018>
32. Kerrigan GL, Norback JP. Linear Programming in the Allocation of Milk Resources for Cheese Making. *Journal of Dairy Science*. 1986;69(5):1432–1440. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(86\)80552-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(86)80552-5)
33. Bliadze VG, Bigaeva AV. Development of the raw materials' consumption rates for the cheese and cottage cheese production. *Dairy Industry*. 2021;(10):59–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2021-10-59-62>; <https://elibrary.ru/UJOYJH>
34. Leong T, Johansson L, Juliano P, Mawson R, McArthur S, Manasseh R. Design parameters for the separation of fat from natural whole milk in an ultrasonic litre-scale vessel. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014;21(4):1289–1298. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.007>
35. Frampton KD, Martin SE, Minor K. The scaling of acoustic streaming for application in micro-fluidic devices. *Applied Acoustics*. 2003;64(7):681–692. [https://doi.org/10.1016/s0003-682x\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/s0003-682x(03)00005-7)
36. Tsymbalov AS. Influence of surface-active substances on dispersion and stability of water oil emulsions. *Modern High Technology. Regional Application*. 2018;(3):108–119. (In Russ.). [Цымбалов А. С. Влияние поверхностно-активных веществ на диспергирование и стабильность водомасляных эмульсий // Современные наукоемкие технологии. Региональное приложение. 2018. № 3. С. 108–119.]. <https://elibrary.ru/YLVEWD>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2542>  
<https://elibrary.ru/NNZPQE>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Морфогистологическая структура печени оленевых (*Cervidae*) как индикатор благополучия их популяций



М. А. Перевозчикова<sup>ORCID</sup>, И. И. Окулова<sup>ORCID</sup>, А. А. Сергеев\*<sup>ORCID</sup>,  
И. А. Домский<sup>ORCID</sup>, В. В. Ширяев<sup>ORCID</sup>, М. Г. Дворников<sup>ORCID</sup>, Б. Е. Зарубин<sup>ORCID</sup>

Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства  
имени профессора Б. М. Житкова, Киров, Россия

Поступила в редакцию: 11.04.2024

Принята после рецензирования: 10.06.2024

Принята к публикации: 02.07.2024

\* А. А. Сергеев: [metalbird@mail.ru](mailto:metalbird@mail.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-9461-5131>

М. А. Перевозчикова: <https://orcid.org/0000-0003-3638-3712>

И. И. Окулова: <https://orcid.org/0000-0001-9938-4769>

И. А. Домский: <https://orcid.org/0000-0003-1633-1341>

В. В. Ширяев: <https://orcid.org/0000-0002-4549-5727>

М. Г. Дворников: <https://orcid.org/0000-0002-8261-5783>

Б. Е. Зарубин: <https://orcid.org/0009-0004-5627-2192>

© М. А. Перевозчикова, И. И. Окулова, А. А. Сергеев,  
И. А. Домский, В. В. Ширяев, М. Г. Дворников, Б. Е. Зарубин, 2024



### Аннотация.

Дикие копытные животные являются подходящими объектами экологического мониторинга в части состояния и качества окружающей среды. На примере представителей семейства оленевых рассмотрена возможность применения морфологических и гистологических структур печени для оценки благополучия популяций, существующих в условиях действия неблагоприятных экологических факторов антропогенного и природного происхождения.

Гистологическим методом исследованы образцы печени трех видов диких копытных животных – благородного оленя (*Cervus elaphus*, Linnaeus, 1758), пятнистого оленя (*Cervus nippon*, Temminck, 1837) и лани (*Dama dama*, Linnaeus, 1758), добытых в процессе охоты в зимний период по разрешениям на научный отстрел на территории двух неограничивающих районов Смоленской области. Гистосрезы изучали с помощью микроскопа MEIJI TECHNO с использованием программного обеспечения Vision Bio (Epi). Статистическую обработку проводили общепринятыми методами с применением корреляционного и однофакторного дисперсионного анализа. Нулевую гипотезу отклоняли на уровне значимости менее 0,05. Результаты исследования продемонстрировали, что в качестве индикаторов пригодны показатели структуры печеночных балок, кровеносных сосудов, очагов некроза, воспалений. На уровне клеток можно оценить количество в поле зрения, структуру, форму и соотношение одно-, двуядерных гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы. Диагностическое значение могут иметь площади клеток, ядер, цитоплазмы, значение ядерно-цитоплазматического индекса. По ряду параметров имеются половозрастные отличия. Выявлены достоверные взаимосвязи изучаемых показателей. У животных, обитающих в территориально неограничивающих районах, установлена сходная гистологическая картина с присутствием патологических трансформаций, включая некротические очаги, появление двуядерных гепатоцитов. Выявлены нарушения структуры печеночных балок и микроциркуляторного русла.

Полученные результаты направлены на решение актуальной научной проблемы оценки благополучия популяций хозяйственно важных видов животных в зависимости от условий окружающей природной среды. Создание системы экологического мониторинга, в котором дикие копытные животные могут рассматриваться как биологические индикаторы этой оценки, поможет усовершенствовать систему наблюдения за состоянием биоты и ее качественными параметрами, обеспечить благополучие поголовья и высокое качество получаемой продукции. Полученные значения гистоморфометрических показателей могут быть использованы для формирования референтных значений в градиенте норма – патология.

**Ключевые слова.** Благородный олень, пятнистый олень, лань, печень, гистопатология, морфология, гепатоцит, индикаторы

**Финансирование.** Работы выполнены в 2023 году во Всероссийском научно-исследовательском институте охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б. М. Житкова (г. Киров) в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.), утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 31 декабря 2020 г. № 3684-р, составляющей основу Государственного задания института (тема «Совершенствование научных основ устойчивого использования, методов оценки, мониторинга и прогноза динамики биологических ресурсов охотничьего хозяйства» (№ FNWS-2022-0001)).

**Для цитирования:** Морфогистологическая структура печени оленевых (*Cervidae*) как индикатор благополучия их популяций / М. А. Перевозчикова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 756–780. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2542>

## Morphohistological Structure of Liver in Wild Deer (*Cervidae*) as Indicator of Population Well-Being

Maria A. Perevozchikova<sup>ID</sup>, Iraida I. Okulova<sup>ID</sup>,  
Alexey A. Sergeev\*<sup>ID</sup>, Igor A. Domsy<sup>ID</sup>, Valeriy V. Shiryaev<sup>ID</sup>,  
Mikhail G. Dvornikov<sup>ID</sup>, Boris E. Zarubin<sup>ID</sup>

Russian Game Management and Fur Farming Research Institute, Kirov, Russia

Received: 11.04.2024  
Revised: 10.06.2024  
Accepted: 02.07.2024

\*Alexey A. Sergeev: [metabird@mail.ru](mailto:metabird@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0002-9461-5131>

Maria A. Perevozchikova: <https://orcid.org/0000-0003-3638-3712>

Iraida I. Okulova: <https://orcid.org/0000-0001-9938-4769>

Igor A. Domsy: <https://orcid.org/0000-0003-1633-1341>

Valeriy V. Shiryaev: <https://orcid.org/0000-0002-4549-5727>

Mikhail G. Dvornikov: <https://orcid.org/0000-0002-8261-5783>

Boris E. Zarubin: <https://orcid.org/0009-0004-5627-2192>

© M.A. Perevozchikova, I.I. Okulova, A.A. Sergeev, I.A. Domsy,  
V.V. Shiryaev, M.G. Dvornikov, B.E. Zarubin, 2024



### Abstract.

Wild ungulates are a convenient object for environmental monitoring. The authors used the histological structures in deer's liver to assess the well-being of populations in unfavorable anthropogenic and natural habitats.

The research featured liver tissues of red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*), and fallow deer (*Dama dama*). The histosections were examined in a MEIJI TECHNO microscope using the Vision Bio (Epi) software. The statistical processing involved traditional methods using the correlation and one-factor analysis of variance. The null hypothesis was rejected at an ingenuity level of  $\leq 0.05$ .

The structure of the hepatic plates, blood vessels, foci of necrosis, and inflammation proved suitable as indicators. The cell count, structure, shape, ratio of mono- and binuclear hepatocytes, as well as their nuclei and cytoplasm, were assessed by microscope. The areas of cells, nuclei, and cytoplasm, as well as the value of the nuclear-cytoplasmic index, demonstrated diagnostic significance. A number of parameters depended on age and sex. The indicators demonstrated reliable correlations. The animals had a similar histological picture, even when the samples were obtained from geographically separated areas. The samples showed pathological transformations, including necrotic foci and binucleate hepatocytes. The structure and microvasculature of hepatic plates were disturbed.

Well-being assessment is a relevant issue for populations of economically important animal species. An environmental monitoring system with wild ungulates as biological indicators could improve the monitoring system for the state of biota and its qualitative parameters, as well as ensure the well-being of the livestock and the high quality of the resulting products. The obtained histomorphometric parameters can be used as reference values in the norm-pathology gradient.

**Keywords.** Red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*), fallow deer (*Dama dama*), liver, histopathology, morphology, hepatocyte, indicators

**Funding.** This research was partially supported by the Russian Academy of Sciences, FSZZ-2019-0001 (AAAA-A19-119020190132-5): Improving the scientific basis for sustainable use, assessment, monitoring, and forecasting of biological hunting resources.

**For citation:** Perevozchikova MA, Okulova II, Sergeev AA, Domsy IA, Shiryaev VV, Dvornikov MG, *et al.* Morphohistological Structure of Liver in Wild Deer (*Cervidae*) as Indicator of Population Well-Being. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):756–780. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2542>

### Введение

Дикие копытные являются неотъемлемой частью природных сообществ большей части территории России и традиционными объектами охотничьего промысла. Современная геополитическая обстановка и

санкции ряда зарубежных стран обостряют проблему обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации как одной из основ обеспечения независимости и экономического суверенитета государства. Согласно современной «Доктрине продоволь-

ственной безопасности Российской Федерации», охотничье хозяйство рассматривается как один из источников пищевой продукции для населения страны, а обеспечение качества и безопасности такой продукции, а также совершенствование методологии ее контроля относятся к числу приоритетных задач государства.

Согласно данным Всероссийского научно-исследовательского института охотничьего хозяйства и звероводства имени профессора Б. М. Житкова, в сезоне 2022–2023 гг. поголовье благородного оленя на территории РФ составило около 192 тыс. особей, численность лося превысила 1 млн, а косули – 1,3 млн особей. Последнее десятилетие устойчиво увеличивается количество охотничьих хозяйств, направленных на интенсивное использование ресурсов диких копытных, растет число питомников, специализирующиеся на разведении оленей в полувольных условиях и искусственной среде обитания, увеличивается производство мяса и прочей продукции оленеводства [1]. Согласно официальной статистике Росстата, в 2022 г. в питомниках на территории Российской Федерации насчитывалось более 2000 косуль, около 200 лосей, почти 11000 благородных оленей, 7000 пятнистых оленей и 5000 ланей. Годовые затраты на их содержание превысили 350 млн руб.

Современная промышленная и сельскохозяйственная деятельность снижает качество среды обитания диких животных. Массовое попадание в компоненты биоты загрязняющих веществ усугубляет экологическую ситуацию. Интенсивная урбанизация приводит к тому, что дикие животные не успевают приспосабливаться к возрастающей антропогенной нагрузке [2–4]. В экологическом аспекте дикие копытные, по сравнению с родственными домашними видами, наименее доступны для исследования, но при этом в наибольшей степени отражают состояние природной среды.

Оценка последствий воздействия загрязняющих веществ на природные сообщества, популяции и отдельные особи необходима для анализа влияния антропогенной деятельности и в реальных условиях возможна с применением морфофизиологических параметров животных в качестве биомаркеров. Последствия токсических воздействий включают генотоксические, ферментативные, гематологические и гистологические изменения, которые возникают только в условиях присутствия в тканях организма высоких концентраций токсикантов [5–16]. Использование биомаркеров в сочетании с данными о биоаккумуляции может обеспечить подходящую оценку состояния здоровья, физиологического статуса и реакции особей и популяций диких копытных млекопитающих на загрязнение [15, 17, 18].

В условиях дичеразведения актуальными становятся вопросы обеспечения качественного кормления, содержания и эпизоотологического благополучия поголовья. Интенсификация кормления оленевых в зимний период является одним из важных условий повышения продуктивности и рентабельности питомников.

Недостаток питательных веществ у животных приводит к существенному снижению живой массы, функциональной активности органов и систем, истощению и ухудшению продуктивных качеств, увеличению случаев заболеваний и падежа [19–21]. Информация о спектре инфекционных и инвазионных болезней диких копытных крайне необходима для проведения последующих ветеринарно-санитарных исследований, оценки безопасности и гигиены мясной продукции. Всесторонние исследования макроскопических или микроскопических изменений гистоструктуры органов и тканей диких копытных не проводятся в должном объеме.

В настоящей работе мы сконцентрировались на гистологическом исследовании печени, которая является основным органом, выполняющим барьерную функцию, и поражается при отравлениях (недоброкачественные корма, микотоксины, тяжелые металлы, агрохимикаты, растительные яды и пр.), гельминтозах (к примеру, наиболее распространенных в настоящее время фасциозе и парамфистоматозе), одним из важных органов при проведении послеубойной ветеринарно-санитарной экспертизы мясной продукции.

Печень – самая крупная железа организма млекопитающих, выполняющая разнообразные функции и отражающая в своей структуре факторы внутренней и внешней среды, в которых обитает живой организм [22–25]. Несмотря на то что внутренние органы составляют приблизительно 6–10 % массы тела, около 20–25 % от общей потребности в основной энергии приходится на метаболизм печени [26]. Печень депонирует ксенобиотики и индицирует загрязнения на организменном и популяционном уровнях [22, 27–29]. Эти факты побуждают многих исследователей изучать различные морфологические и физиологические аспекты этой железы у разных видов животных.

Важность подобного рода исследований на природных объектах в свое время подчеркивал один из авторов применения морфофизиологических индикаторов в изучении экологии животных, академик С. С. Шварц, который утверждал, что «индикатором условий существования животных могут быть не только абсолютные значения индексов, но и характер различий в развитии отдельных органов у различных внутривидовых групп животных» [30].

Интерес к печени как к объекту исследования не угасает и со стороны биологов, и медиков, поскольку до настоящего времени остаются нерешенными вопросы ее функциональных и компенсаторно-приспособительных свойств.

В общебиологическом аспекте этот орган вызывает интерес исследователей главным образом уникальностью морфологии, включая особенности кровоснабжения, регенеративных свойств и поддержания тканевого гомеостаза. В организме животных печень кровоснабжается из двух сосудов: артериального (собственно печеночная артерия – *a. hepatica propria*), обеспечивающего печень кислородом, и венозного (воротная вена –

*v. portae*), которые доставляют питательные и биологически активные вещества, кислород, а также токсины, всосавшиеся в кишечнике и подлежащие детоксикации. Удаление конечных продуктов обмена веществ осуществляют печеночные вены (*vv. hepaticae*). Между двумя венозными системами имеются порто-кавальные анастомозы, благодаря которым в системе воротной вены снижается давление и уменьшается сопротивление работе сердца. Уникальность кровоснабжения печени состоит в системе синусоидных капилляров, позволяющих быстро выделять в кровоток синтезируемые печенью вещества, необходимые для экстренной адаптации организма (глюкоза, факторы свертывания крови, ангиотензиноген и др.), и поглощать из крови вещества, требующие обезвреживания. Капиллярная сеть замедляет кровоток в органе, что является одним из условий полноценной реализации этих функций [31].

Регенеративные свойства печени и механизмы поддержания тканевого гомеостаза остаются недостаточно изученными. Основная ткань печени представляет собой совокупность гепатоцитов и относится к обновляющимся растущим тканям. Восстановление органа происходит за счет дифференцированных клеток, расположенных на периферии классических долек. Эти клетки мигрируют по печеночным пластинкам по направлению к центральным венам. По мере созревания они перемещаются к центру дольки, стареют и завершают свой жизненный цикл апоптозом. Механизм миграции гепатоцитов, имеющих прочные связи с соседними клетками, непонятен: перемещаются не отдельные гепатоциты, а их комплексы, т. е. печеночные пластинки. В этот комплекс включены и клетки синусоидных капилляров, и клетки перисинусоидальных пространств.

Гепатоциты – основные клетки печени, имеют одно или несколько ядер. Наличие многоядерных и полиплоидных гепатоцитов отражает приспособительные изменения печени, поскольку эти клетки крупнее и способны выполнять гораздо большие по объему функции, чем обычные гепатоциты. Их число может резко возрастать при функциональных нагрузках на печень. Непосредственно в гепатоцитах происходит детоксикация различных ксенобиотиков (экзогенных ядов, лекарственных веществ и др.), гормонов и эндогенных ядов; синтезируются белки крови (фибриноген, протромбин, альбумины, глобулины), осуществляется биосинтез и секреция желчи, депонируется гликоген, жир, белок, витамины и пр.

Анализ имеющихся литературных данных показал, что морфологические параметры печени многих видов диких животных, включая размеры и характеристики клеток, недостаточно изучены, особенно в половом и возрастном аспектах, а морфометрические характеристики гепатоцитов приводятся крайне редко и требуют уточнения [15, 22, 32].

В силу особенностей микростроения изменения в тканях печени могут быть использованы в каче-

стве гистологических биомаркеров влияния токсинов [22, 33]. Целью исследования являлась предварительная оценка возможности использования морфогистологической структуры печени диких копытных семейства оленевых для мониторинга благополучия популяций этих животных и качества окружающей их природной среды в условиях подзоны хвойно-широколиственных лесов европейской части России.

#### Объекты и методы исследования

Исследованы морфометрические параметры печени трех видов диких копытных, населяющих лесные экосистемы Смоленской области: благородного оленя (*Cervus elaphus*, Linnaeus, 1758) ( $n = 6$ , из них 3 ♀ взрослые, 3 ♂ взрослых), пятнистого оленя (*Cervus nippon*, Temminck, 1837) ( $n = 3$ , из них 1 ♂ полуторогодовалый, 2 ♂ взрослых) и лани (*Dama dama*, Linnaeus, 1758) ( $n = 2$ , из них 1 ♀ взрослая, 1 ♂ взрослый). Животные были добыты в процессе охоты в зимний период по разрешениям на научный отстрел на территории двух неграничащих районов области. Отстрел производился с вышек в районе подкормочных площадок. Все добытые животные находились в хорошем физическом состоянии, без видимых признаков патологий. Сопутствующие заболевания в каждом конкретном случае не установлены. Отбор биопроб производился в охотничьих угодьях одним из авторов непосредственно после отстрела. Определялась видовая принадлежность, пол и возрастная группа. При вскрытии печень имела темно-бордовый цвет, на разрезе без видимых изменений, капсула с печени снималась легко. Биоматериал для гистологических исследований фиксировали в 10 % водном растворе нейтрального формалина. Дальнейшие работы осуществляли в лабораторных условиях.

После фиксации материал промывали в водопроводной воде для удаления остатков формалина и обезвоживали в спиртах с возрастающей концентрацией (от 37 до 96 %). В 70 % спирте выдерживали при комнатной температуре 1 ч и переносили в 60 % спирт в 3-х порциях (I, II и III), ставили в термостат при температуре 70 °С на 30 мин каждую. Затем проводили уплотнение материала – пропитывание уплотняющими средами. В качестве уплотнителя применяли ксилол с добавлением такого же объема 96 % спирта и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Далее при комнатной температуре переносили в ксилол I и II по 3 мин для удаления спирта и помещали в термостат при температуре 37 °С на 3 ч. Переносили в чистый I, II и III парафин и выдерживали в каждом по 1 ч при температуре 60 °С. После этого заливали в чистый парафин и готовили парафиновые блоки. Изготовление срезов толщиной 5 мкм производили на ротационном полуавтоматическом микротоме RMD-3000 (Россия). Гистосрезы сушили на термостатном столике, после чего окрашивали. Депарафинирование

срезов проводили ксилолом, при этом выдерживали в ксилоле I и II и переносили в спирты нисходящей концентрации (96 % спирт I, II, III) по 5 мин, затем в 70 % спирт на 3 мин. Выдерживали в дистиллированной воде 5 мин и помещали в красители.

Препараты окрашивали гематоксилином Майера и эозином [34, 35]. После окраски на гистосрезы при помощи быстросохнущего средства Sub-X Mounting Medium (США) наклеивали покровные стекла.

Каждый окрашенный гистосрез исследовали с помощью светового микроскопа MEIJI TECHNO (Япония) с объективом на 20× и иммерсионной системой с объективом на 100×.

Гистологическая картина печени сходна во всех препаратах, мы исследовали у каждого животного в 5 полях зрения морфометрические признаки одно- и двухядерных гепатоцитов, а также количество двухядерных гепатоцитов на одно поле зрения. Измеряли только те гепатоциты, которые имели четкий контур клетки и ядра. У гепатоцитов проводили измерения площади, у их ядер – площади и диаметра, ядерно-цитоплазматический индекс, ширины синусоидных капилляров. Измеряли площадь центральных и поддольковых вен, вычисляли отношение площади поддольковой вены к центральной вене для установления нарушений микроциркуляторного русла. Определяли количество очагов некроза на одно поле зрения и площадь каждого очага.

Вышеуказанные параметры устанавливали с использованием программного обеспечения для обработки изображений для медицины и биологии Vision Bio (Epi) (Австрия). Всего исследованы параметры 462 одноядерных гепатоцитов, 64 двухядерных гепатоцитов, 340 синусоидных капилляров, 73 центральных вен, 62 поддольковых вен, 132 очагов некроза.

Для анализа видовых особенностей клеток печени использовали объединенные выборки животных всех половозрастных групп. К группе *juv* + отнесены животные в возрасте 1,5 года.

Изучение морфологических параметров животных, входящих в семейство оленевых, на протяжении многих лет актуально для биологической науки. Особый интерес представляют олени, обитающие в дикой природе и находящиеся под воздействием естественных и антропогенных факторов [36–38].

Полноценные исследования пищеварительного тракта животных требуют одновременного изучения гомеостаза клеток печени, поскольку печень является биохимической лабораторией организма, где происходит синтез белка, процессы детоксикации, секреция желчи и т. д. [39].

В настоящее время описательный подход к изучению патологических процессов в печени является недостаточным. Для точной и объективной оценки изменений в органах и тканях следует использовать микроскопические, морфометрические методы исследования и статистический анализ полученных результатов, что не только повышает качество оценки, характера

и описания изучаемых явлений, но и объективизирует морфологический диагноз.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения MS Excel (Office 2019) и Statgraphics (19-X64) общепринятыми методами [40]. Для описания выборок определяли среднее значение (*M*), медиану (*Me*), ошибку среднего (*m*), стандартное отклонение (*SD*), 25–75 перцентили. Поскольку были основания предполагать, что в ряде случаев распределение полученных нами значений отличалось от нормального, наряду с параметрическими активно использовались и непараметрические методы анализа. Для проверки достоверности различий между двумя выборками использовались критерии Стьюдента, Фишера, метод множественного сравнения Ньюмена-Кейсла, а также непараметрические критерии Манна-Уитни. Для сравнения нескольких независимых выборок по одному признаку применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA-test) и непараметрический дисперсионный анализ с использованием критерия Краскала-Уоллиса. Для выяснения взаимосвязи между несколькими выборками рассчитывали коэффициенты ранговой корреляции Спирмена и использовали регрессионный анализ. Нулевую гипотезу отклоняли на уровне значимости менее 0,05.

### **Результаты и их обсуждение**

При исследовании образцов печени пятнистого и благородного оленей, ланей установлена сходная гистологическая картина (рис. 1–3). Дольки печени состоят из радиально расположенных печеночных балок, структура которых нарушена. Между печеночными балками видны расширенные синусоидные капилляры, в просвете которых имеются эритроциты, которые особенно выражены у благородного оленя. Структурной единицей печени является долька, между дольками выявляются типичного строения триады и собирательные вены. В центре долек визуализируется полнокровие центральных вен. Границы между дольками прослеживаются нечетко. Междольковая соединительная ткань развита слабо. При микроскопии препаратов одноядерные гепатоциты полигональной формы. В них четко выявляется округлое, однородно окрашенное ядро и гомогенная цитоплазма розового цвета. Обнаруживаются двухядерные гепатоциты, их количество отличается у разных видов копытных.

Практически у всех животных выявлены обширные очаги некроза с регенерацией, сопровождающиеся появлением двухядерных и гипертрофированных гепатоцитов, мутное набухание цитоплазмы и нечеткие границы большинства клеток. Цитоплазма печеночных клеток имеет грубый зернистый вид (белковые зерна), ядро в одних случаях с плохо различимой хроматиновой структурой, в других случаях видны лишь тени ядра, окрашенные в голубоватый цвет. Некоторые ядра гепатоцитов находятся в состоянии кариолизиса – растворения.

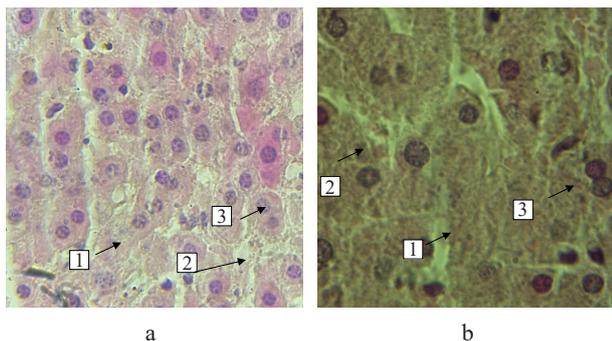


Рисунок 1. Печень пятнистого оленя (самец, 1,5 года): 1 – кариолизис гепатоцитов; 2 – расширенные синусоидные капилляры; 3 – двуядерные гепатоциты. Окраска гематоксилином Майера и эозином. Увеличение 1000×

Figure 1. Liver of a sika deer (male, 1.5 years): 1 – karyolysis of hepatocytes; 2 – dilated sinusoidal capillaries; 3 – binuclear hepatocytes. Stained with Mayer's hematoxylin and eosin, 1000×

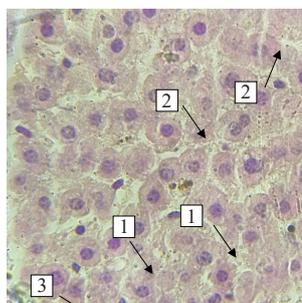


Рисунок 2. Печень лани (самец, взрослый): 1 – кариолизис гепатоцитов; 2 – расширенные синусоидные капилляры; 3 – двуядерные гепатоциты. Окраска гематоксилином Майера и эозином. Увеличение 1000×

Figure 2. Liver of fallow deer (male, adult): 1 – karyolysis of hepatocytes; 2 – dilated sinusoidal capillaries; 3 – binuclear hepatocytes. Stained with Mayer's hematoxylin and eosin, 1000×

Морфометрические параметры одноядерных гепатоцитов трех видов копытных представлены в таблице 1.

Установлены корреляционные связи между морфометрическими параметрами одноядерных гепатоцитов. Наиболее тесная связь у всех исследованных видов выявлена между площадью гепатоцитов и площадью цитоплазмы, площадью и диаметром ядер (табл. 2). Между площадью гепатоцитов и площадью их ядер отмечена тесная положительная корреляционная связь у взрослых самок и самцов благородного оленя; взрослых самцов пятнистого оленя. Между площадью гепатоцитов и диаметром их ядер отмечена средняя положительная корреляционная связь у взрослых самок и самцов (r = 0,50; p = 0,00) благородного оленя. Наиболее тесная положительная корреляционная связь у всех видов выявлена между площадью

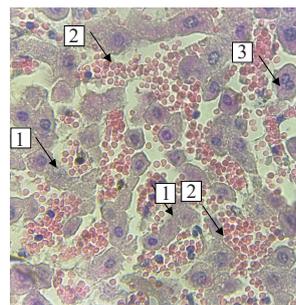


Рисунок 3. Печень благородного оленя (самка, взрослая): 1 – кариолизис гепатоцитов; 2 – расширенные синусоидные капилляры с эритроцитами; 3 – двуядерные гепатоциты. Окраска гематоксилином Майера и эозином. Увеличение 1000×

Figure 3. Red deer liver (female, adult): 1 – karyolysis of hepatocytes; 2 – dilated sinusoidal capillaries with erythrocytes; 3 – binuclear hepatocytes. Stained with Mayer's hematoxylin and eosin, 1000×

однойядерных гепатоцитов и площадью цитоплазмы. Между площадью гепатоцитов и ядерно-цитоплазматическим индексом установлена отрицательная корреляционная связь. Сильная положительная связь определена между площадью и диаметрами ядер гепатоцитов у взрослых самок и самцов благородного оленя. Положительная связь средней силы – между площадью ядер и площадью цитоплазмы, площадью ядер и ядерно-цитоплазматическим индексом установлена у благородных оленей и ланей. Отрицательная корреляционная связь выявлена между площадью цитоплазмы и ядерно-цитоплазматическим индексом во всех группах животных.

Морфометрические параметры двуядерных гепатоцитов трех видов копытных представлены в таблице 3.

Установлены корреляционные связи между морфометрическими параметрами двуядерных гепатоцитов. Отмечена тесная положительная корреляционная связь между площадью гепатоцитов и площадью их ядер у взрослых самцов пятнистого оленя (r = 0,78; p = 0,00) и взрослой самки лани (r = 0,78; p = 0,03); между площадью гепатоцитов и площадью цитоплазмы у взрослых самок (r = 0,86; p = 0,00) и самцов (r = 0,95; p = 0,00) благородного оленя, у взрослых самцов пятнистого оленя (r = 0,96; p = 0,00) и взрослой самки лани (r = 0,95; p = 0,01); между площадью ядер и площадью цитоплазмы у взрослых самцов пятнистого оленя (r = 0,63; p = 0,00). Установлена тесная положительная корреляционная связь между площадью ядер и ядерно-цитоплазматическим индексом у взрослых самок (r = 0,78; p = 0,00) и самцов (r = 0,63; p = 0,03) благородного оленя и средняя – у взрослых самцов пятнистого оленя (r = 0,58; p = 0,00). Между площадью цитоплазмы и ядерно-цитоплазматическим индексом определена средняя отрицательная корреляция у взрослых самок благородного оленя (r = -0,59;

$p = 0,03$ ); тесная у взрослых самцов благородного оленя ( $r = -0,64$ ;  $p = 0,03$ ), полторогодовалого самца пятнистого оленя ( $r = -1,00$ ;  $p = 0,00$ ) и взрослого самца лани ( $r = -1,00$ ;  $p = 0,00$ ). Также выявлена тесная корреляционная связь между взрослыми самцами благородного оленя и взрослым самцом лани по площади гепатоцитов ( $r = -1,00$ ;  $p = 0,00$ ); между взрослыми самцами пятнистого оленя и взрослой самкой лани по площади ядер

Таблица 1. Морфометрические признаки одноядерных гепатоцитов трех видов оленей

Table 1. Morphometric profiles of mononuclear hepatocytes from three deer species

Пол, возраст животного	Число измерений	Площадь гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	Ядра гепатоцитов		Площадь цитоплазмы, мкм <sup>2</sup>	Ядерно-цитоплазматический индекс
			Площадь, мкм <sup>2</sup>	Диаметр, мкм		
Благородный олень						
♀ ad	153	81,35–201,84	16,99–47,37	5,14–9,45	62,37–168,59	0,14–0,35
min–max						
M		135,37 <sup>C</sup>	24,06 <sup>A,C</sup>	6,58 <sup>A,C</sup>	111,31 <sup>C</sup>	0,22
Me		133,44 <sup>C</sup>	22,96 <sup>C</sup>	6,48 <sup>A,C</sup>	108,61 <sup>C</sup>	0,21
m		1,90	0,38	0,06	1,69	0,00
SD		23,43	4,72	0,75	20,80	0,04
25–75 %		116,71–148,34	21,08–25,77	6,03–6,99	95,41–124,3	0,19–0,24
♂ ad	183	79,60–200,58	14,86–35,41	4,79–8,40	63,72–171,61	0,11–0,32
min–max						
M		132,45	22,89 <sup>A,D,E</sup>	6,37 <sup>A,D</sup>	109,55	0,21 <sup>E</sup>
Me		131,65	23,19 <sup>D,E</sup>	6,35 <sup>A,D,E</sup>	108,08	0,21 <sup>D,E</sup>
m		1,83	0,31	0,05	1,63	0,00
SD		24,65	4,26	0,72	22,02	0,03
25–75 %		113,22–149,32	19,48–25,68	5,86–6,86	93,40–123,89	0,19–0,23
Пятнистый олень						
♂ juv +	29	79,75–151,56	17,75–27,48	5,50–7,46	59,44–127,46	0,17–0,34
min–max						
M		121,49	22,59	6,47 <sup>B</sup>	98,90	0,23 <sup>B</sup>
Me		120,56	22,40 <sup>B</sup>	6,49 <sup>B</sup>	99,44	0,23 <sup>B</sup>
m		3,85	0,43	0,10	3,63	0,01
SD		20,38	2,30	0,51	19,22	0,04
25–75 %		107,95–140,45	21,38–24,44	6,15–6,79	83,61–115,48	0,20–0,25
♂ ad	50	89,35–208,84	14,83–31,84	4,66–7,58	68,72–181,54	0,11–0,32
min–max						
M		131,76	21,36 <sup>D,F</sup>	6,11 <sup>B,D,F</sup>	110,40	0,20 <sup>B,F</sup>
Me		122,52	20,96 <sup>B,D,F</sup>	6,04 <sup>B,D,F</sup>	103,39	0,20 <sup>B,D,F</sup>
m		4,72	0,56	0,10	4,30	0,01
SD		32,74	3,94	0,74	30,23	0,05
25–75 %		107,09–145,68	18,22–23,58	5,58–6,66	88,03–124,43	0,17–0,23
Лань						
♀ ad	21	86,44–158,17	15,78–28,69	5,29–7,09	70,66–131,21	0,14–0,33
min–max						
M		122,95 <sup>A,C</sup>	21,69 <sup>A,C</sup>	6,15 <sup>C</sup>	101,25 <sup>C</sup>	0,22 <sup>A</sup>
Me		117,74 <sup>A,C</sup>	21,30 <sup>A,C</sup>	5,98 <sup>A,C</sup>	94,73 <sup>C</sup>	0,22 <sup>A</sup>
m		4,11	0,71	0,11	3,82	0,01
SD		18,84	3,28	0,51	17,51	0,04
25–75 %		110,08–139,62	20,08–22,05	5,80–6,41	89,34–119,35	0,20–0,23
♂ ad	25	92,59–186,99	16,35–37,10	0,37–8,55	72,47–165,77	0,13–0,37
min–max						
M		135,99 <sup>A</sup>	27,01 <sup>A,E,F</sup>	6,65 <sup>F</sup>	108,98	0,25 <sup>A,E,F</sup>
Me		136,58 <sup>A</sup>	26,61 <sup>A,E,F</sup>	6,84 <sup>A,E,F</sup>	110,25	0,26 <sup>A,E,F</sup>
m		4,58	1,09	0,31	4,35	0,01
SD		22,46	5,32	1,51	21,31	0,06
25–75 %		115,71–151,46	22,18–30,60	6,33–7,35	94,05–118,74	0,22–0,29

Примечание: Различия достоверны при  $p > 0,05$ : <sup>A</sup> – между ♀ и ♂; <sup>B</sup> – между 1,5-годовалыми ♂ и взрослыми ♂ пятнистого оленя; <sup>C</sup> – между взрослыми ♀ благородного оленя и взрослыми ♀ лани; <sup>D</sup> – между взрослыми ♂ благородного и пятнистого оленей; <sup>E</sup> – между взрослыми ♂ благородного оленя и взрослыми ♂ лани; <sup>F</sup> – между взрослыми ♂ пятнистого оленя и взрослыми ♂ лани.

Note: Differences are significant at  $p > 0.05$ : <sup>A</sup> – a female vs. a male; <sup>B</sup> – a 1.5-year-old male sika deer vs. an adult female sika deer; <sup>C</sup> – an adult female red deer vs. an adult female fallow deer; <sup>D</sup> – an adult male red deer vs. an adult male sika deer; <sup>E</sup> – an adult male red deer vs. an adult male fallow deer; <sup>F</sup> – an adult male sika deer vs. an adult male fallow deer.

Таблица 2. Корреляционные связи между морфометрическими параметрами одноядерных гепатоцитов  
Table 2. Correlations between morphometric profiles of mononuclear hepatocytes

Пары признаков	<i>r</i>	<i>p</i>
Площадь гепатоцитов – площадь ядер гепатоцитов		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,62	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	0,67	0,00
Пятнистый олень, ♂ полуторогодовалый	0,54	0,00
Пятнистый олень, ♂ взрослые	0,61	0,00
Лань, ♀ взрослая	0,48	0,02
Площадь гепатоцитов – диаметр ядер гепатоцитов		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,42	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	0,50	0,00
Пятнистый олень, ♂ полуторогодовалый	0,40	0,03
Пятнистый олень, ♂ взрослые	0,50	0,00
Площадь гепатоцитов – площадь цитоплазмы		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,98	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	0,98	0,00
Пятнистый олень, ♂ полуторогодовалый	0,99	0,00
Пятнистый олень, ♂ взрослые	0,99	0,00
Лань, ♀ взрослая	0,98	0,00
Лань, ♂ взрослый	0,97	0,00
Площадь гепатоцитов – ядерно-цитоплазматический индекс		
Благородные олени, ♀ взрослые	–0,34	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	–0,41	0,00
Пятнистый олень, ♂ полуторогодовалый	–0,80	0,00
Пятнистый олень, ♂ взрослые	–0,62	0,00
Лань, ♀ взрослая	–0,50	0,01
Лань, ♂ взрослый	–0,45	0,02
Площадь ядер – диаметр ядер		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,82	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	0,84	0,00
Пятнистый олень, ♂ полуторогодовалый	0,74	0,00
Пятнистый олень, ♂ взрослые	0,83	0,00
Лань, ♀ взрослая	0,85	0,00
Площадь ядер – площадь цитоплазмы		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,47	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	0,55	0,00
Пятнистый олень, ♂ полуторогодовалый	0,46	0,01
Пятнистый олень, ♂ взрослые	0,53	0,00
Площадь ядер – ядерно-цитоплазматический индекс		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,50	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	0,37	0,00
Лань, ♀ взрослая	0,50	0,01
Лань, ♂ взрослый	0,66	0,00
Диаметр ядер – площадь цитоплазмы		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,29	0,00
Пятнистый олень, ♂ взрослые	0,43	0,00
Диаметр ядер – ядерно-цитоплазматический индекс		
Благородные олени, ♀ взрослые	0,52	0,00
Лань, ♀ взрослая	0,51	0,01
Площадь цитоплазмы – ядерно-цитоплазматический индекс		
Благородные олени, ♀ взрослые	–0,49	0,00
Благородные олени, ♂ взрослые	–0,53	0,00
Пятнистый олень, ♂ полуторогодовалый	–0,85	0,00
Пятнистый олень, ♂ взрослые	–0,69	0,00
Лань, ♀ взрослая	–0,18	0,04
Лань, ♂ взрослый	–0,64	0,00

Таблица 3. Морфометрические признаки двуядерных гепатоцитов трех видов оленей

Table 3. Morphometric profiles of binuclear hepatocytes across three deer species

Пол, возраст животного	Число измерений	Площадь гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	Площадь ядер гепатоцита, мкм <sup>2</sup>	Площадь цитоплазмы, мкм <sup>2</sup>	Ядерно-цитоплазматический индекс
Благородный олень					
♀ ad	13	144,60–199,75	34,10–53,87	107,50–158,52	0,24–0,50
min–max					
M		175,03	43,42	131,61 <sup>c</sup>	0,33
Me		171,10	42,53	129,83 <sup>c</sup>	0,33
m		5,63	2,21	5,14	0,02
SD		19,51	7,67	17,80	0,07
25–75 %		161,37–196,46	36,11–50,94	117,71–148,07	0,28–0,36
♂ ad	12	134,62–223,27	29,31–57,37	98,15–175,17	0,20–0,58
min–max					
M		181,59	45,17 <sup>d</sup>	136,42	0,34
Me		183,32	46,63 <sup>d</sup>	137,78	0,31
m		8,99	2,54	8,47	0,03
SD		29,82	8,44	28,11	0,10
25–75 %		163,44–203,46	41,29–50,54	110,03–158,24	0,28–0,36
Пятнистый олень					
♂ juv+	5	118,78–242,61	39,53–54,08	75,75–195,60	0,24–0,57
min–max					
M		181,37	46,51	134,86	0,38
Me		180,91	47,01 <sup>b</sup>	128,20	0,38
m		21,97	2,78	21,60	0,06
SD		43,94	5,57	43,19	0,13
25–75 %		177,09–187,44	43,03–48,89	126,83–147,91	0,27–0,43
♂ ad	23	114,40–220,99	27,57–61,75	82,80–159,24	0,24–0,47
min–max					
M		163,96	38,80 <sup>d</sup>	125,16	0,31
Me		162,46	38,18 <sup>b,d</sup>	120,95	0,29
m		5,74	1,79	4,48	0,01
SD		26,94	8,38	21,03	0,05
25–75 %		145,04–183,50	32,87–41,06	110,45–140,29	0,28–0,34
Лань					
♀ ad	8	117,74–194,45	31,46–57,24	86,28–141,29	0,31–0,43
min–max					
M		152,99	41,35	111,63 <sup>c</sup>	0,37
Me		142,75	37,95	108,17 <sup>c</sup>	0,37
m		11,15	3,54	8,06	0,02
SD		29,51	9,37	21,34	0,05
25–75%		130,24–180,21	34,59–46,21	92,68–131,87	0,33–0,40
♂ ad	3	162,37–177,06	37,61–54,35	113,83–136,68	0,29–0,48
min–max					
M		169,20	44,11	125,09	0,36
Me		168,18	40,38	124,76	0,30
m		5,23	6,34	8,08	0,07
SD		7,40	8,97	11,43	0,10
25–75 %		165,27–172,62	38,99–47,36	119,29–130,72	0,30–0,39

Примечание: Различия достоверны при  $p > 0,05$ : <sup>A</sup> – между ♀ и ♂; <sup>B</sup> – между 1,5-годовалыми ♂ и взрослыми ♂ пятнистого оленя; <sup>C</sup> – между взрослыми ♀ благородного оленя и взрослыми ♀ лани; <sup>D</sup> – между взрослыми ♂ благородного оленя и взрослыми ♂ пятнистого оленя.

Note: Differences are significant at  $p > 0.05$ : <sup>A</sup> – males vs. females; <sup>B</sup> – a 1.5-year-old male sika deer vs. an adult male sika deer; <sup>C</sup> – an adult female red deer vs. an adult female fallow deer; <sup>D</sup> – an adult male red deer vs. an adult male sika deer.

( $r = 0,95$ ;  $p = 0,00$ ) по ядерно-цитоплазматическому индексу; между взрослыми самками благородного оленя и взрослой самкой лани ( $r = 0,80$ ;  $p = 0,03$ ), между взрослыми самками и самцами лани ( $r = -1,00$ ;  $p = 0,00$ ) по ядерно-цитоплазматическому индексу.

Количество двуядерных гепатоцитов и их доля на одно поле зрения микроскопа представлены на рисунке 4.

Выявлены достоверные различия ( $p > 0,05$ ) ширины синусоидных капилляров между самцами и

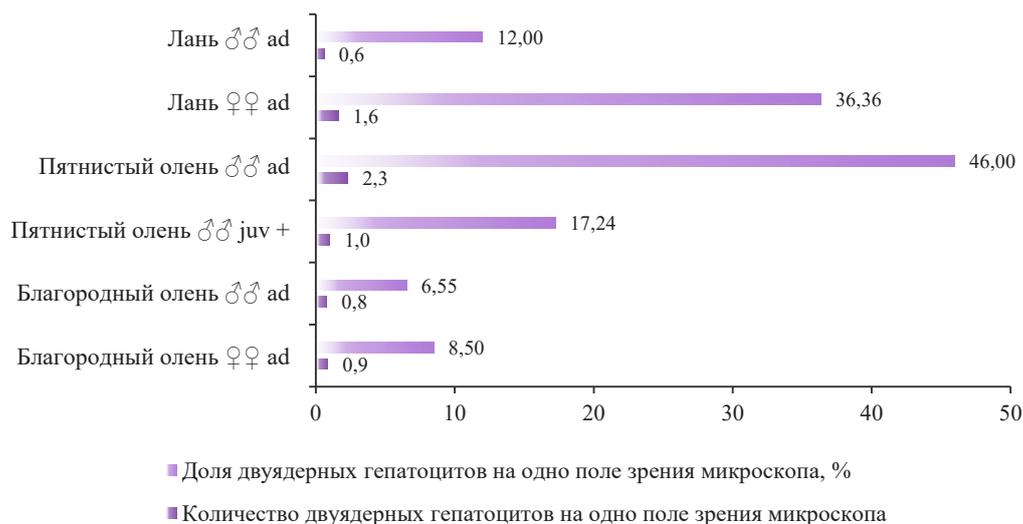


Рисунок 4. Количество двуядерных гепатоцитов и их доля на одно поле зрения микроскопа

Figure 4. Binuclear hepatocyte count and their proportion per field of view

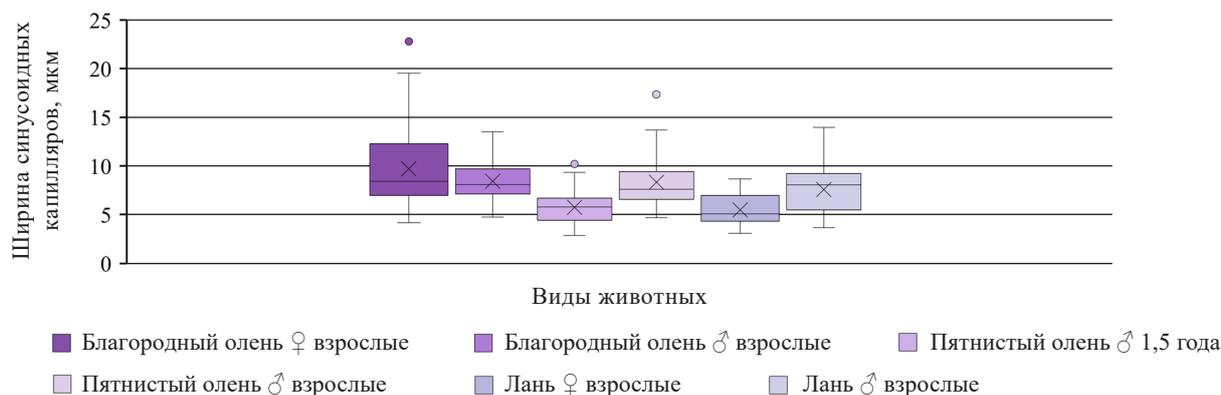


Рисунок 5. Ширина синусоидных капилляров у трех видов оленей

Figure 5. Width of sinusoidal capillaries in liver across three deer species

самками у благородного оленя и возрастные отличия у пятнистого оленя. Показатели взрослых самок благородного оленя и лани достоверно отличались (рис. 5).

По ширине синусоидных капилляров нами была установлена корреляционная связь между взрослыми самками благородного оленя и взрослыми самками пятнистого оленя ( $r = 0,28$ ;  $p = 0,04$ ); между взрослыми самками благородного оленя и взрослым самцом лани ( $r = -0,43$ ;  $p = 0,03$ ); между взрослыми самками благородного оленя и взрослым самцом лани ( $r = 0,42$ ;  $p = 0,03$ ).

Морфометрические параметры центральных и поддольковых вен печени трех видов копытных представлены в таблице 4.

Определена сильная положительная корреляционная связь по площади центральной вены между взрослыми самцами благородного оленя и взрослой сам-

кой ( $r = 1,00$ ;  $p = 0,00$ ) и самцом ( $r = 0,69$ ;  $p = 0,03$ ) лани, по площади поддольковой вены между полуторогодовалым самцом пятнистого оленя и взрослой самкой ( $r = 1,00$ ;  $p = 0,00$ ) и самцом ( $r = 1,00$ ;  $p = 0,00$ ) лани.

Площадь некрозов печени у диких копытных представлены в таблице 5.

При определении площади очагов некроза мы не выявили достоверных различий в их размерах в зависимости от вида, возраста или пола. При определении количества очагов некроза на одно поле зрения установлено, что наибольшее их количество отмечено у взрослого самца лани (5), а также полуторогодовалого самца (2,8) и взрослых самцов (2,8) пятнистого оленя и самок (2,4) благородного оленя. Меньше очагов некроза выявлено у взрослых самцов лани (1,8) и благородного оленя (1,4). Количество участков некроза на одно поле зрения микроскопа представлено на рисунке 6.

Корреляционные связи некоторых морфогистологических параметров печени оленей представлены в таблице 6.

Различные факторы могут оказывать значительное влияние на параметры печени. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA-test) позволил

Таблица 4. Морфометрические параметры центральных и поддольковых вен печени трех видов оленей

Table 4. Morphometric parameters of central and sublobular veins in liver across three deer species

Вид животного	Центральная вена, площадь, мкм <sup>2</sup>	Поддольковая вена, площадь, мкм <sup>2</sup>
<b>Благородный олень</b>		
♀ ad		
число измерений	15	15
min–max	2699,78–10279,94	1559,75–6544,55
M	4886,20 <sup>C</sup>	5079,73 <sup>A,C</sup>
Me	4505,92	5083,78 <sup>A,C</sup>
m	602,43	411,94
SD	2254,09	1541,33
25–75 %	3249,14–4976,37	4762,37–6421,36
♂ ad		
число измерений	32	26
min–max	1570,16–8471,97	1269,25–7822,39
M	4962,31	3609,51 <sup>A</sup>
Me	5373,04	2921,30 <sup>A</sup>
m	388,03	392,59
SD	2160,48	1962,96
25–75 %	3116,94–6739,70	2092,91–5017,68
<b>Пятнистый олень</b>		
♂ juv +		
число измерений	7	3
min–max	309,51–906,21	651,40–746,08
M	650,15 <sup>B</sup>	688,41
Me	714,52 <sup>B</sup>	667,76 <sup>B</sup>
m	91,19	35,78
SD	223,37	50,61
25–75 %	512,26–798,14	659,58–706,92
♂ ad		
число измерений	5	7
min–max	3508,66–5263,90	775,00–7515,37
M	4244,76 <sup>B</sup>	3296,60
Me	3970,19 <sup>B</sup>	2960,37 <sup>B</sup>
m	346,58	852,95
SD	693,17	2089,29
25–75 %	3875,83–4605,23	2401,84–3510,89
<b>Лань</b>		
♀ ad		
число измерений	4	6
min–max	3641,19–17281,05	2059,13–14897,38
M	11193,03 <sup>A,C</sup>	7347,92 <sup>C</sup>
Me	11924,95	5378,16 <sup>C</sup>
m	3670,28	2617,56
SD	6357,12	5853,04
25–75 %	7146,04–15971,93	2603,73–12366,36
♂ ad		
число измерений	10	5
min–max	2516,53–9941,83	1927,76–6118,71
M	6163,29 <sup>A</sup>	4679,36
Me	5703,20	5230,19
m	846,53	814,88
SD	2539,59	1629,77
25–75 %	4892,84–7692,92	4619,44–5500,69

Примечание: Различия достоверны при  $p > 0,05$ : <sup>A</sup> – между ♀ и ♂; <sup>B</sup> – между 1,5-годовалыми ♂ и взрослыми ♂ пятнистого оленя; <sup>C</sup> – между взрослыми ♀ благородного оленя и взрослыми ♀ лани.

Note: Differences are significant at  $p > 0.05$ : <sup>A</sup> – males vs. females; <sup>B</sup> – a 1.5-year-old male sika deer vs. an adult male sika deer; <sup>C</sup> – an adult female red deer vs. an adult female fallow deer.

Таблица 5. Площадь некрозов, мкм<sup>2</sup>, в печени трех видов оленей

Table 5. Necrosis area, μm<sup>2</sup>, in liver across three deer species

Пол, возраст	Число измерений	lim	M	Me	m	SD	25–75 %
Благородный олень							
♀♀ ad	36	176,22–750,74	344,43	311,73	22,15	131,05	249,70–402,21
♂♂ ad	21	170,73–582,32	359,44	329,65	25,48	113,95	265,20–455,2
Пятнистый олень							
♂ juv +	14	178,17–875,60	385,57	294,60	67,43	243,12	234,03–363,40
♂♂ ad	28	132,10–936,08	362,81	303,18	34,18	177,61	252,35–470,99
Лань							
♀♀ ad	9	206,33–639,81	326,86	308,70	46,49	131,50	257,26–315,42
♂♂ ad	25	150,97–977,84	350,81	300,59	42,83	209,81	249,50–332,69

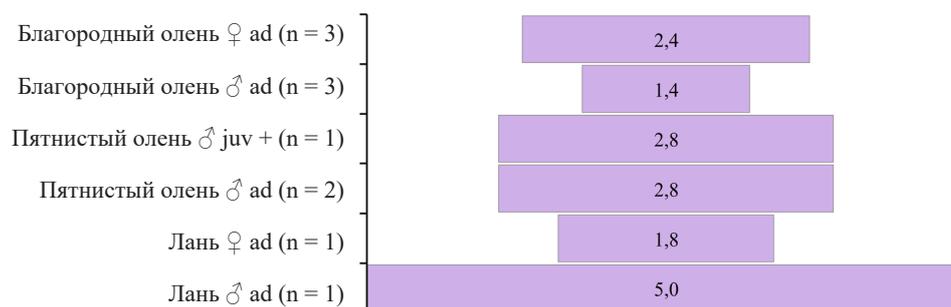


Рисунок 6. Количество участков некроза на одно поле зрения микроскопа

Figure 6. Number of necrotic areas per field of view

Таблица 6. Корреляционные связи морфогистологических параметров печени оленей

Table 6. Correlations between morphohistological parameters of liver across three deer species

Вид	Пары признаков	r	p
Благородный олень, ♀♀ ad	Одноядерные гепатоциты площадь клетки – ширина синусоидных капилляров	0,23	0,01
	Одноядерные гепатоциты площадь ядра – ширина синусоидных капилляров	0,26	0,00
	Одноядерные гепатоциты площадь цитоплазмы – ширина синусоидных капилляров	0,19	0,04
	Двухядерные гепатоциты площадь цитоплазмы – центральная вена площадь	-0,64	0,02
Пятнистый олень, ♂ juv +	Одноядерные гепатоциты площадь клетки – поддольковая вена площадь	-1,00	0,00
	Одноядерные гепатоциты диаметр ядра – поддольковая вена площадь	-1,00	0,00
	Одноядерные гепатоциты площадь цитоплазмы – поддольковая вена площадь	-1,00	0,00
	Двухядерные гепатоциты площадь цитоплазмы – поддольковая вена площадь	1,00	0,00
	Двухядерные гепатоциты ЯЦИ – поддольковая вена площадь	-1,00	0,00
Пятнистый олень, ♂♂ ad	Некроз площадь – поддольковая вена площадь	-1,00	0,00
	Двухядерные гепатоциты ЯЦИ – некроз площадь	-0,44	0,04
Лань, ♀♀ ad	Двухядерные гепатоциты площадь ядра – некроз площадь	-0,62	0,00
	Одноядерные гепатоциты площадь ядра – центральная вена площадь	0,81	0,02
Лань, ♂♂ ad	Центральная вена диаметр – поддольковая вена площадь	1,00	0,00
	Одноядерные гепатоциты площадь ядра – двухядерные гепатоциты площадь клетки	-1,00	0,00
	Одноядерные гепатоциты диаметр ядра – двухядерные гепатоциты площадь клетки	-1,00	0,00
	Одноядерные гепатоциты площадь цитоплазмы – двухядерные гепатоциты площадь клетки	-1,00	0,00
	Одноядерные гепатоциты ЯЦИ – двухядерные гепатоциты площадь клетки	-1,00	0,00
	Двухядерные гепатоциты площадь ядра – ширина синусоидных капилляров	1,00	0,00
	Двухядерные гепатоциты площадь ядра – поддольковая вена площадь	-1,00	0,00
	Двухядерные гепатоциты ЯЦИ – центральная вена площадь	1,00	0,00
	Двухядерные гепатоциты площадь ядра – некроз площадь	1,00	0,00
Двухядерные гепатоциты площадь цитоплазмы – центральная вена площадь	-1,00	0,00	

установить влияние возраста и пола на параметры структур паренхимы печени.

У благородных оленей установлено достоверное влияние фактора пола на площадь ядер одноядерных гепатоцитов ( $p = 0,01$ ; % влияния – 1,66); на диаметр ядер одноядерных гепатоцитов ( $p = 0,01$ ; % влияния – 1,94); на площадь подольковых вен ( $p = 0,01$ ; % влияния – 13,69).

У благородных оленей установлено достоверное влияние возраста на диаметр ядер одноядерных гепатоцитов ( $p = 0,02$ ; % влияния – 6,74); на ширину синусоидных капилляров ( $p = 0,00$ ; % влияния – 23,50); на площадь ( $p = 0,00$ ; % влияния – 94,43) центральных вен.

У ланей выявлено достоверное влияние пола на площадь одноядерных гепатоцитов ( $p = 0,03$ ; % влияния – 9,23); на площадь ядер одноядерных гепатоцитов ( $p = 0,00$ ; % влияния – 26,72); на ядерно-цитоплазматический индекс одноядерных гепатоцитов ( $p = 0,02$ ; % влияния – 11,09); на ширину синусоидных капилляров ( $p = 0,00$ ; % влияния – 22,36); на площадь центральных вен ( $p = 0,04$ ; % влияния – 28,73).

**Одноядерные гепатоциты.** Установлены достоверные ( $p > 0,05$ ) различия в площади одноядерных гепатоцитов между взрослыми самками (122,95 мкм<sup>2</sup>) и самцами (135,99 мкм<sup>2</sup>) лани, а также между взрослыми самками благородного оленя (135,37 мкм<sup>2</sup>) и лани (122,95 мкм<sup>2</sup>).

Достоверно отличались и площади ядер гепатоцитов между самками и самцами благородного оленя (24,06 и 22,89 мкм<sup>2</sup> соответственно) и лани (21,69 и 27,01 мкм<sup>2</sup> соответственно); между самками благородного оленя (24,06 мкм<sup>2</sup>) и лани (21,69 мкм<sup>2</sup>); между взрослыми самцами благородного (22,89 мкм<sup>2</sup>) и пятнистого оленей (21,36 мкм<sup>2</sup>), а также лани (27,01 мкм<sup>2</sup>); между взрослыми самцами пятнистого оленя (21,36 мкм<sup>2</sup>) и лани (27,01 мкм<sup>2</sup>).

Достоверные отличия имели диаметры ядер гепатоцитов между самками и самцами благородного оленя (6,58 и 6,37 мкм соответственно); между полуторогодовалыми и взрослыми самцами пятнистого оленя (6,47 и 6,11 мкм соответственно); между самками благородного оленя (6,58 мкм) и лани (6,15 мкм); между взрослыми самцами пятнистого (6,11 мкм) и благородного (6,37 мкм) оленей, а также лани (6,65 мкм).

Площадь цитоплазмы достоверно отличалась только между самками благородного оленя и лани (111,31 и 101,25 мкм<sup>2</sup> соответственно).

Ядерно-цитоплазматический индекс имел достоверные отличия между взрослыми самками (0,22) и самцами (0,25) лани; между полуторогодовалыми и взрослыми самцами пятнистого оленя (0,23 и 0,20 соответственно); между взрослыми самцами лани (0,25) и благородного (0,21), а также пятнистого (0,20) оленей.

С. А. Веремеева с соавторами изучали морфогистологические особенности внутренних органов сибирской косули [37]. При гистологическом исследовании

печени установили, что гепатоциты имеют округлую форму и площадь  $230,81 \pm 1,31$  мкм<sup>2</sup>, их ядра имеют следующие морфометрические параметры: площадь  $22,62 \pm 1,80$  мкм<sup>2</sup>, диаметр  $5,37 \pm 0,21$  мкм, ядерно-цитоплазматический индекс  $0,10 \pm 0,01$ . Хорошо визуализируются триады с печеночными артериолой и венулой, при этом венулы по наружному и внутреннему диаметру превышают артериолы в 1,46 и 3,10 раза соответственно.

У. R. Montanholi с соавторами доказали взаимосвязи между эффективностью корма и гистоморфометрией печени у крупного рогатого скота [26]. Повышение эффективности корма связано с увеличением количества гепатоцитов и повышением скорости метаболизма в паренхиме печени. Исследователями были установлены следующие параметры: площадь гепатоцитов ( $302,66 \pm 36,29$  мкм<sup>2</sup>), площадь их ядер ( $68,93 \pm 14,12$  мкм<sup>2</sup>).

А. А. Zaitoun с соавторами наблюдали, что снижение метаболизма печени в результате хирургических манипуляций у крыс приводит к гипотрофии гепатоцитов [41].

По данным С. А. Рага и др., у истощенных белохвостых оленей средний размер ядер гепатоцитов значительно меньше по сравнению с животными с нормальным весом [23]. Аналогичные результаты получены при исследовании оленей при ограниченном кормлении. Это привело к значительному снижению массы тела и количества здоровых клеток, что указывает на снижение энергетических затрат.

**Двухядерные гепатоциты.** При изучении двухядерных гепатоцитов нами установлены достоверные ( $p > 0,05$ ) различия в площади их ядер между взрослыми самцами благородного и пятнистого оленей (45,17 и 38,80 мкм<sup>2</sup> соответственно). Площадь цитоплазмы имела достоверные отличия между самками благородного оленя и лани (131,61 и 108,17 мкм<sup>2</sup> соответственно).

Количество двухядерных гепатоцитов связывают с митотической активностью, свидетельствующей о восстановлении структуры печени после различного рода повреждений. У животных со средним течением хронического гепатита гепатоциты значительно изменены. Встречающиеся среди гепатоцитов печени двухядерные клетки рассматриваются как регенераторный резерв, способный компенсировать негативное воздействие, в том числе поражение токсинами естественного или антропогенного происхождения. К примеру, у человека двухядерные гепатоциты в норме составляют до 20 % от общего числа клеток на единицу площади [23]. В. И. Федюк, Д. Н. Казаков отмечают, что у собак при гепатите примерно у 20 % гепатоцитов выявлена двухядерность, что свидетельствует о наличии репаративных процессов в органе [42]. В наших исследованиях число двухядерных гепатоцитов на одно поле зрения микроскопа преобладало у полуторогодовалого (1,00) и взрослых самцов (2,30) пятнистого оленя, а также у

взрослых самок лани (1,6), при этом их доля в среднем составила 17,24, 46,00 и 36,36 % соответственно.

В гепатоцитах обнаружили выраженную вакуолизацию цитоплазмы, изменения размеров ядер, пониженный ядерно-цитоплазматический индекс. В отдельных случаях наблюдали плохое прокрашивание ядер с одновременным их увеличением, что характерно для кариолизиса. Выражена метахромазия, нарушение окраски цитоплазмы и ядра. В некоторых клетках установлена сильная вакуолизация при наличии нормальных ядер, в которых ядрышки выглядят уменьшенными, сморщенными и сильно прокрашенными. У собак с тяжелым течением гепатита гепатоциты изменены, разрушены, в цитоплазме – значительная вакуолизация. Клетки разного размера, ядерно-цитоплазматический индекс изменен в пользу цитоплазмы, ядра практически отсутствовали, в них с трудом выявлялись ядрышки. Двухядерных гепатоцитов мало, что связано с отсутствием регенеративных процессов [42].

**Ядерно-цитоплазматический индекс.** Ядерно-цитоплазматический индекс – отношение между площадями цитоплазмы и ядра клетки, важная морфологическая характеристика, позволяющая оценить уровень метаболизма и выявить компенсаторные реакции [45]. Соотношение размеров цитоплазмы и ядра различно в разных клетках организма. При диагностике паталогических изменений проводят морфометрические исследования клеток и оценивают степень отклонения этих параметров от нормальной клетки того же типа. Ядерно-цитоплазматический индекс (отношение) показывает, в каком состоянии находится клетка. Если данное отношение  $\geq 1$ , это значит, что в клетке крупное ядро и немного цитоплазмы. Такое отношение имеют стволовые клетки, малые лимфоциты, стареющие клетки: функционально неактивные, но обладающие способностью делиться. Клетки, у которых ядерно-цитоплазматический индекс  $< 1$ , имеют больший объем цитоплазмы и большое количество органелл, высокодифференцированы и имеют высокую функциональную активность. В нашем исследовании наиболее высокий ядерно-цитоплазматический индекс одноядерных гепатоцитов отмечен у взрослых самцов лани (0,25) и полуторогодовалого пятнистого оленя (0,23), а двухядерных гепатоцитов – у полуторогодовалого пятнистого оленя (0,38) и самок и самцов лани (0,37 и 0,36 соответственно).

**Синусоидные капилляры, центральные и поддольковые вены.** Расширение синусоидных капилляров, в просветах которых визуализируются эритроциты, указывает на нарушение микроциркуляторного русла вследствие воспалительного процесса. Установлены достоверные отличия в ширине синусоидных капилляров печени между самцами и самками благородного оленя (9,71 и 8,41 мкм соответственно) и лани (5,47 и 7,51 мкм соответственно); между полуторогодовалым и взрослыми самцами пятнистого оленя (5,76 и 8,33 мкм соответственно); между самками

благородного оленя и лани (9,71 и 5,47 мкм соответственно), что говорит о более высоком уровне метаболизма и компенсаторных реакциях.

Достоверные отличия в площади поддольковых вен установлены между взрослыми самками (5079,73 мкм<sup>2</sup>) и самцами (3609,51 мкм<sup>2</sup>) благородного оленя, между полуторогодовалым (688,41 мкм<sup>2</sup>) и взрослыми самцами (3296,60 мкм<sup>2</sup>) пятнистого оленя, а также между взрослыми самками благородного оленя (5079,73 мкм<sup>2</sup>) и лани (7347,92 мкм<sup>2</sup>).

**Центральные вены.** Выявлены достоверные отличия в площади центральных вен между взрослыми самкой (11193,03 мкм<sup>2</sup>) и самцом (6163,29 мкм<sup>2</sup>) лани, между полуторогодовалым (650,15 мкм<sup>2</sup>) и взрослыми (4244,76 мкм<sup>2</sup>) самцами пятнистого оленя, а также между взрослыми самками благородного оленя (4886,20 мкм<sup>2</sup>) и лани (11193,03 мкм<sup>2</sup>). Центральные вены собирают кровь с дольки, затем она направляется в поддольковые вены и далее в печеночные. В норме поддольковая вена должна быть большей площади по сравнению с центральной. Для установления нарушений микроциркуляторного русла нами проведены вычисления по соотношению площадей поддольковых вен к центральным венам печени. У взрослых самцов благородного и пятнистого оленей, взрослых самки и самца лани площадь поддольковых вен оказалась меньше площади центральных вен в 0,73, 0,78, 0,6 и 0,76 раз, что говорит о нарушении микроциркуляторного русла. У взрослых самок благородного оленя и полуторогодовалого самца пятнистого оленя соотношение площадей поддольковых вен к центральным венам печени составило 1,04 и 1,06 соответственно (рис. 7).

**Взаимосвязь некоторых исследуемых признаков.** Некоторые из исследованных нами признаков в равной степени коррелированы у всех видов, например, выявлена положительная связь площади одноядерных гепатоцитов с площадью их ядер (от  $r = 0,48$  у самок лани до  $r = 0,67$  у самок благородного оленя), диаметром их ядер (от  $r = 0,40$  у полуторогодовалого самца пятнистого оленя до  $r = 0,50$  у самцов благородного и пятнистого оленей), площадью цитоплазмы ( $r > 0,97$  во всех исследуемых группах) и отрицательная связь площади одноядерных гепатоцитов с ядерно-цитоплазматическим индексом (от  $r = -0,34$  у самок благородного оленя до  $r = -0,80$  у полуторогодовалого самца пятнистого оленя). Значимую отрицательную корреляцию имеют площадь цитоплазмы и ядерно-цитоплазматический индекс как у одноядерных, так и у двухядерных гепатоцитов. Во всех группах животных у двухядерных гепатоцитов не коррелировала их площадь с диаметром ядер и ядерно-цитоплазматическим индексом. Наблюдаемые различия связаны с видовыми особенностями изучаемых видов.

**Некротические изменения тканей.** Исследуемые нами образцы показали значительное число и тяжесть паталогических изменений, а именно очагов некроза

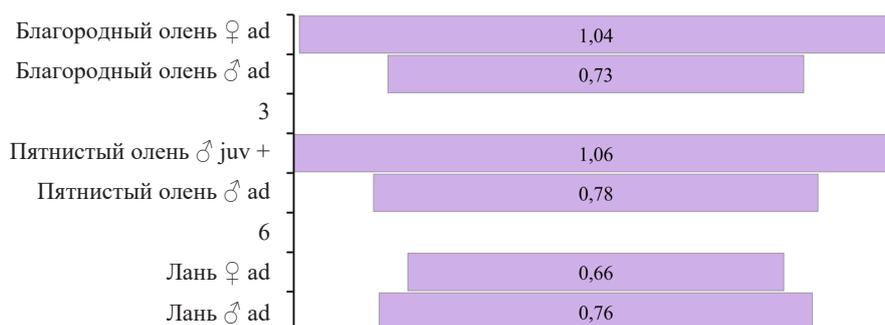


Рисунок 7. Соотношение площадей центральных и поддольковых вен печени у трех видов оленей

Figure 7. Central vs. sublobular vein areas in liver across three deer species

клеток в тканях печени. В печени всех групп копытных зарегистрированы очаги некроза. Наличие некротических изменений в тканях печени преимущественно говорит о токсическом воздействии на организм животных. Причинами такого воздействия могут быть поллютанты техногенного происхождения из окружающей среды, недоброкачественные или неподходящие для животных корма и минеральные подкормки. Токсикозы могут возникать при наличии инфекционных заболеваний, гельминтозов, стресс-факторов, включая повышенную плотность населения, фактор беспокойства, в том числе в результате охотничьего воздействия и др., но в любом случае токсикозы свидетельствуют о неблагоприятном состоянии популяции.

Анализ совокупности морфогистологических параметров позволяет предположить, что вероятной причиной наблюдаемых патологических изменений может быть паразитарная инвазия (фасциоз, эхинококкоз) или воздействие загрязняющих веществ.

**Реакция тканей печени на негативные воздействия.** Гистоструктура печени может реагировать на воздействие различных негативных факторов, связанных с патологическими состояниями, включая инфекции и паразитарные инвазии, токсическое воздействие загрязняющих веществ, неполноценное, недостаточное или избыточное питание, поведенческий стресс, избыточные физические нагрузки и др. Некоторые из этих факторов могут оказывать значимое влияние на благополучие популяций, однако их выявление в практике хозяйствования затруднительно. Своевременная и достоверная оценка таких факторов крайне актуальна для обеспечения рационального использования ресурсов, осуществления экологического мониторинга, получения качественной и безопасной пищевой продукции.

**Гельминтозы.** Некоторые эндопаразиты оказывают влияние на функцию печени, вызывая ее патологические изменения. По данным В. Bergmane с соавторами, гистопатологическое исследование положительных образцов из печени лося с инвазией *Parafasciolopsis fasciolaemorphia* выявило разрастание междолько-

вой соединительной ткани, определяемой как междольковый фиброз, который окружает печеночные доли, сосуды и желчные протоки, а также гиперплазию желчевыводящих путей [44]. В контрольной группе количество междольковых желчных протоков, расположенных в портальной области, в среднем составляло от трех до пяти, в то время как в положительных образцах их количество было больше на десять. Воспалительная клеточная инфильтрация макрофагами и нейтрофилами определена в портальных областях и вокруг желчных протоков, что указывает на перихолангит. Некоторые желчные протоки заполнены известковыми отложениями, которые могут вызвать обструкцию желчевыводящих путей. Ранее названные патологические изменения в печени приводят к расширению желчных протоков [45].

Сходные патологические изменения в печени происходят при воздействии других печеночных трематод: печеночной двуустки (*Fasciola hepatica*), гигантской фасциолы (*Fasciola gigantica*), ланцетовидной двуустки (*Dicrocoelium dendriticum*) и особо опасного гигантского печеночного сосальщика (*Fascioloides magna*) [48]. К. Matsuda с соавторами отмечали, что более 70 % внутрипеченочных поражений у пятнистого оленя связано с фасциозом [47]. При обследовании 1381 пятнистого оленя, забитых на мясо на фермах острова Хоккайдо (Япония), у 621 отмечено утолщение и расширение крупных внутрипеченочных желчных протоков и фасциоловые сосальщики в просветах протоков. При микроскопировании печеночной ткани у 107 особей отмечены нежелчные поражения (внутрипеченочные и капсулярные). Гистологические поражения желчных протоков включали хронический пролиферативный холангит, папиллярную гиперплазию, метаплазию бокаловидных клеток и пилорических желез, а также перидуктальный фиброз. Некроз, кровоизлияние и образование эозинофильной гранулемы, поражения желчных протоков, в том числе внутрипеченочных и капсулярных, образование лимфоидной ткани связаны с миграцией фасциол в печени. В некоторых случаях в лимфоид-

ной ткани присутствовали эозинофильные гранулемы, в центре которых находились эозинофильные и/или минерализованные остатки. В других – между лимфоидными фолликулами наблюдалась инфильтрация лимфоцитами, эозинофилами и многоядерными гигантскими клетками. Некроз паренхимы печени зараженных оленей включал деструктивный некроз с кровоизлияниями, вызванный миграцией неполовозрелых сосальщиков, и коагуляционный некроз, который связан с токсическими выделениями сосальщиков [48].

Аналогичные поражения наблюдались у животных и человека при поражении печеночными двуустками семейства *Opisthorchiidae* [49]. В патологии человека к таким гиперпластическим и хроническим воспалительным состояниям применяется термин «хронический пролиферативный холангит» или «аденоматозная гиперплазия» [50].

J. Lamb с соавторами установили у ланей, акклиматизированных в дикой природе на севере Нового Южного Уэльса (Австралия), а также содержащихся здесь на фермах, высокий уровень устойчивости к фасциолезу, вызываемому печеночной двуусткой [51]. В эндемичных регионах лани нередко являются хозяевами маритной стадии этого паразита. У пораженных животных наблюдались патологические изменения в печени, включающие фиброз и атрофию периферических отделов левой доли. Четко выраженные фиброзные капсулы захватывают двуусток и ограничивают их миграцию за пределы периферической области левой доли печени, что подтверждается присутствием здесь живых и мертвых двуусток.

F. Karimov с соавторами отмечали у инфицированного фасциолезом крупного рогатого скота увеличенный размер печени, плотную текстуру, бугристую поверхность, утолщенную капсулу, толстые, извилистые, расширенные желто-белые тяжи желчных протоков [52]. Гистологическими и морфометрическими методами выявлены структурные изменения в гепатоцитах, печеночных дольках и системе микроциркуляции печени. Архитектоника структуры долек гепатоцитов осталась неизменной, междольковое пространство расширилось. В некоторых гепатоцитах наблюдаются дистрофия и некробиоз. Обнаружены отдельные участки печеночных долек со значительным деструктивным процессом. Имеются выраженные гистологические изменения в кровеносных сосудах печени. Междольковые и центральные вены печени инфильтрированы лейкоцитами. В области печеночной триады много лимфоидных клеток, которые также проникают по синусоидальным капиллярам долей печени. Они образуют небольшие скопления лимфоидных клеток внутри долей печени. Гистологическое исследование показало увеличение просвета центральных вен за счет утолщения стенки до 6,6 мкм. Дольковая структура гепатоцитов разрушена и сохраняется только в определенных полях зрения. Размер ядра в клетках печени имеет тенденцию к увеличению. Имеются многочисленные

гепатоциты без ядер. Оставшиеся ядра расположены ближе к периферии клетки. Вокруг центральной вены в долях печени были собраны лимфоидные клетки с компактным ядром или ядрышками на площади до 667 мкм<sup>2</sup>.

Гистологические исследования печени сильно инфицированных животных показали нарушение структуры гепатоцитов. Из-за уменьшения количества гликогена и накопления жировых включений в гепатоцитах среди здоровых клеток появились очаги некротической ткани в паренхиме печени. Эти небольшие очаги некроза паренхимы имели очаговые инфильтраты из макрофагов, лимфоцитов и нейтрофилов. Наблюдались выраженная пролиферация и гипертрофия клеток Купфера. Отдельные очаги с сохранившейся пластинчатой структурой гепатоцитов разрушили морфологические структуры. Междольковые капилляры расширены и полнокровны. Полнокровные синусоидальные капилляры расширяют пространство между печеночными пластинками. Стенка артерий утолщена из-за соединительной ткани. В печеночных дольках вдоль центральных вен, синусоидах капилляров и зоне триады имеются скопления клеточных элементов с плотными ядрами. Они имели форму тяжей 68×480 мкм или узелков 16,8×34,6 – 178,2×190,3 мкм. В результате гиперплазии железистого эпителия слизистая оболочка желчных протоков утолщена. Морфометрические исследования свидетельствуют о том, что у животных увеличение размеров печеночных долек обусловлено увеличением объема цитоплазмы гепатоцитов вследствие жировой инфильтрации и разложения внутриклеточных структур. Объем ядер не увеличивается, а ядерно-цитоплазматическое соотношение резко уменьшается. Это признак значительного снижения синтетической активности гепатоцитов. Причиной дистрофических изменений в гепатоцитах являются нарушения кровообращения и застойные явления в желчных протоках. При гистологическом исследовании образцов печени контрольных животных паренхима долек представлена гепатоцитами, расположенными в виде пластинок. Цитоплазма имела зернистую структуру. Гепатоциты расположены плотно, с четкими контурами, а их цитолемма хорошо очерчена. Ядра гепатоцитов занимают центральное положение, содержат многочисленные выраженные ядрышки. Строма умеренно выражена и состоит из мягких волокон рыхлой соединительной ткани. Синусоидальные капилляры между дольками развиты умеренно, шириной 4,6 мкм и длиной 109 мкм. В строме дольки имеются структурные элементы триад. Площадь стромы под триадами находится в пределах 0,16 мкм<sup>2</sup>. В желчных протоках высота выстилающего эпителия с каймой составляет 3,00 ± 0,025 мкм. Цилиндрические эпителиальные клетки желчных протоков расположены в один ряд. При фасциолезе интоксикация организма усиливается за счет разложения скопившейся желчи [53].

При поражении различными формами эхинококкоза (*Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis* и др.) печень почти всегда является основным местом развития метацестод, что не может не сказываться на ее морфогистологических параметрах. Современные методы серологической диагностики, основанные на выявлении специфических антител, не отличаются высокой чувствительностью и осложнены перекрестной реакцией с цистицеркозом, вызываемым *Taenia solium* [54]. Постмортальные гистологические исследования могут способствовать диагностике этого опаснейшего паразитоза, оценке его воздействия на популяции и прогнозированию риска для здоровья человека. В современной научной литературе описания картины поражения тканей печени у диких животных крайне скудны. На макроскопических срезах печени человека метацестода в начальной стадии развития обычно демонстрирует многочисленные очаги некроза с образованием полостей, заполненных жидкостью и некротическим материалом. Наблюдаются образованные паразитом микроскопические кисты, состоящие из относительно тонкой оболочки и нежного зародышевого слоя, часто имеющего лишь несколько ядер; нередко зародышевый листок неразличим. Кисты окружены внутренней зоной некротической ткани и наружными слоями гистиоцитов и лимфоцитов. На более поздних стадиях вокруг кист наблюдаются тканевые реакции хронического воспаления, часто с реакцией на гигантоклеточное тело, фиброзная ткань и кальцификаты. Часто пролиферация фиброзной ткани настолько интенсивна, что кисты погружаются в очень плотную и твердую строму, которая может быть как частично кальцинированной, так и полостью, заполненной аморфным некротическим материалом, а в некоторых случаях также складчатыми слоями паразита [55].

На срезах печени крупного рогатого скота из турецкой провинции Эскишехёр, пораженных *E. granulosus*, в большинстве случаев выявлены паразитарные структуры окружены линией воспалительных клеток, мононуклеарными клетками, эозинофильными гранулоцитами, эпителиоидными клетками и гигантскими клетками инородных тел. Некротическая область иногда кальцифицировалась, вокруг гидатидных кист наблюдалась сильная фиброзная пролиферация. При PAS-реакции выявлено положительное окрашивание бесклеточных структур паразитарной кисты [58]. Есть основания полагать, что аналогичным образом может выглядеть гистоструктура печени оленей.

**Микроэлементозы.** М. Damek-Poprawa, К. Sawicka-Karusta, S. H. Jadhav с соавторами указывают, что среди изменений тканей и клеток печени хроническое воздействие тяжелых металлов вызывает некроз и апоптоз гепатоцитов, что приводит к вакуолизации цитоплазмы, свидетельствующей о токсичности и канцерогенности [57, 58]. Невозможно определить, какой именно токсический элемент вызвал конкретное поражение из-за того, что популяции диких ко-

пытных зачастую подвергаются интегрированному воздействию различных загрязняющих веществ [59].

Многие нарушения гистоструктуры тканей печени млекопитающих (например, фиброзные трансформации, некрозы, воспаления), представляющие собой неспецифические изменения, часто носят хронический характер и могут быть обусловлены различными причинами, включая стресс, голодание, инфекцию и/или длительное или неоднократное воздействие токсичных веществ, таких как ртуть, кадмий или свинец.

У человека хроническое отравление свинцом ассоциируется с увеличением размеров печени, утолщением стенок желчного пузыря и жировым перерождением печени [60, 61]. Разнообразные нарушения гистоструктуры тканей печени наблюдали у китообразных с высокими уровнями ртути, мышьяка, свинца, кадмия и высокоорганических загрязнителей в организме [62]. У грызунов отравление свинцом вызывало нарушение нормальной анатомической организации долек печени, гибель клеток печени, застойные явления, вызванные синусами, закупорку центральных вен, острые воспаления и стеатоз [63]. При экспериментальном гистологическом исследовании печени крыс, отравившихся свинцом, отмечен некроз гепатоцитов, сменяющийся воспалительными скоплениями, образованием междольковых фиброзных тяжей, переходом в портальный фиброз, вызывающий, помимо перегрузки кровеносных сосудов, пролиферацию эпителия желчных протоков [64].

Несмотря на обилие данных, связывающих токсические эффекты с возрастом и полом, у обыкновенной белозубки (*Crocidura russula*) не обнаружено зависимых вариаций по этим двум параметрам. Отсутствие гистологических изменений в почках, семенниках или яичниках у землероек может свидетельствовать о более высокой толерантности этих тканей к воздействию тяжелых металлов. Эта физиологическая адаптация к хроническому влиянию токсикантов связана с эффективными системами детоксикации, в том числе с важной ролью печени в детоксикации ксенобиотиков, поступающих с кормом [29].

Вакуолярные изменения в клетках печени, эозинофилы в паренхиме и гиперплазия желчных путей как предполагаемые следствия воздействия токсичных микроэлементов зафиксированы у оленей на фермах и в дикой природе [65, 66]. По результатам исследований в Восточной Австрии показана значимая роль загрязнения среды кадмием в процессе возникновения гистопатологических изменений почек европейской косули ( $n = 224$ ) [67]. Частота вакуолярной дегенерации цитоплазмы, пикнотических ядер, кариолиза и некроза, отложения пигмента и утолщение капсулы Боумена были связаны с повышенным уровнем кадмия в организме. У косуль из промышленно развитых регионов изменения наблюдались чаще, чем у животных из сельской местности. Данные о гистоструктуре печени в статье не приводятся, и до сих пор не уста-

новлено, является ли воздействие кадмия из окружающей среды единственной причиной наблюдаемых гистопатологических изменений. Результаты этого исследования четко демонстрируют, что хроническое отравление кадмием может быть важным кофактором в патогенетических механизмах повреждения морфогистоструктуры внутренних органов у косули.

В Мексике у благородных оленей, погибших от энзимической атаксии, вызванной дефицитом меди, был выявлен умеренный фиброз тканей печени, локализованный на капсулярном уровне [68]. Обильное отложение гемосидерина в гепатоцитах и клетках Купфера было описано у благородных оленей при меддефицитной атаксии [69, 70]. Диффузный гемосидероз часто встречается у истощенных животных и может быть результатом катаболизма крови и мышечной ткани в период недостаточного приема пищи [71, 72]. Дефицит меди может привести к гемосидерозу из-за нарушения повторного использования железа в гемоглобине или к гемолитической анемии [73]. Накопление большого количества железа в гепатоцитах приводит к гепатоцеллюлярному повреждению [74]. Гемосидероз печени, предположительно, был причиной повышения уровня гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке, поскольку эта пептидаза, катализирующая гидролитическое расщепление пептидов, является одним из наиболее чувствительных показателей для мониторинга и диагностики заболеваний гепатобилиарной системы [75].

**Поведенческий стресс.** В работах ряда авторов указывается, что в результате хронического стресса могут происходить структурные и функциональные изменения ткани печени, выражающиеся в дегенеративных и деструктивных изменениях гепатоцитов, увеличении числа двуядерных клеток и количества ядрышек в ядрах, нарушении структуры плазматической мембраны гепатоцитов, гидратации и вакуолизации цитоплазмы, появлении очагов некроза, расширении внутридольковых синусоидных капилляров, различных застойных явлениях, холестазах и изменении репаративных процессов [76–79].

Исследования А. Е. Белых с соавторами выявили, что в результате хронического эмоционально-болевого стресса у животных происходит снижение функциональной клеточной массы, показателя ядерной массы, увеличение масс-митотического индекса, показателя средней площади гепатоцитов [76]. Данные изменения авторы эксперимента связывают с развитием дегенеративных и деструктивных процессов, полнокровия, застойных явлений и холестаза в ткани печени.

А. Н. Литвиненко и др. установили, что у животных, перенесших хронический стресс, морфологические изменения в печени проявлялись в нарушении кровообращения и дистрофическими изменениями гепатоцитов [78]. Определялось статистически значимое увеличение числа двуядерных клеток и функционального кариоклеточного индекса. Полученные в эксперименте изменения морфологических и морфометри-

ческих показателей ткани печени характеризуются как активация репаративных процессов в ответ на интенсификацию прооксидантного статуса на фоне хронического стресса. Значимыми факторами, приводящими к повреждению гепатоцитов в условиях хронического стресса, являются увеличение прооксидантного статуса в ткани печени и снижение активности ферментной антиоксидантной системы [79]. На увеличение прооксидантного статуса в ткани печени указывают данные, полученные в результате ежедневной 2-часовой иммобилизации в течение 5 дней крыс линии Вистар. Авторы отмечают увеличение концентрации малонового диальдегида, снижение активности каталазы, увеличение активности супероксиддисмутазы в ткани печени [80]. Интенсификация прооксидантного статуса в ткани печени в условиях хронического стресса приводит к активации гепатоцитов. Общим признаком является восстановление ДНК за счет полиполиидизации, а восстановлению структуры печени в определенной степени способствует образование двуядерных гепатоцитов [81, 82]. К. J. Andersen с соавторами установили, что стресс-индуцированная депрессия не влияет на сложный процесс регенерации печени после 70 % гепатэктомии у крыс [83].

**Печень диких травоядных как орган-индикатор при экологическом мониторинге.** Для оценки состояния загрязнения наземной биоты на территории исследований использованы печеночные ткани трех видов копытных. Благодаря особенностям питания, высокой мобильности и большой продолжительности жизни олени весьма восприимчивы к токсическим, паразитарным и стрессовым воздействиям и могут рассматриваться в качестве наиболее чувствительных биоиндикаторов состояния окружающей среды [84]. Для оценки негативных последствий могут быть использованы некоторые морфогистоструктуры печени. Гистопатологическая оценка тканей-мишеней является оптимальным биомаркером, который предоставляет важную качественную и количественную информацию об острых или хронических последствиях воздействия негативных факторов среды, иногда не столь точно прогнозируемых другими индикаторами [85, 86]. Подобный подход ранее тестировался на лабораторных животных и свободноживущих микромаммалиях [14, 22, 57, 87]. Адаптация его к применению на диких копытных позволит получить достоверную информацию о качестве охотничьей продукции, разработать систему наблюдения за окружающей природной средой и верно оценивать благополучие популяций [2, 4].

Органеллы, клетки, ткани, органы, индивидуумы, популяции, сообщества или экосистемы могут страдать от пагубных последствий воздействия токсичных веществ. Важным и сложным вопросом является точное понимание того, как загрязняющие вещества влияют на каждый из этих организационных уровней. Оценка воздействия загрязнения окружающей среды на биоту является главной задачей импактного

мониторинга, несмотря на очевидные трудности, вызванные постоянно меняющимися условиями окружающей среды и высокой внутривидовой изменчивостью.

К. D. Reynolds и др. предположили, что дикие микромаммалии, населяющие загрязненные участки, более чувствительны к воздействиям негативных факторов среды, чем животные, являющиеся объектами лабораторных экспериментов [10]. Лабораторные животные обычно содержатся в строгих контролируемых условиях, с минимальными колебаниями абиотических (температура, влажность, фотопериод и т. д.) и биотических факторов (пол, возраст). Протоколы контролируемых экспериментов обычно предусматривают равномерное воздействие на животных одного токсичного соединения в известной и постоянной концентрации. И наоборот, природные популяции существуют в условиях неконтролируемых многочисленных факторов среды, таких как паразитозы или ограниченная доступность корма, которые могут способствовать ухудшению состояния их здоровья. Количество энергии, доступной для основных видов деятельности и защиты от токсических последствий воздействия инородных агентов, значительно уменьшается. В дикой природе их пагубное воздействие часто включает комбинацию потенциально токсичных соединений. Эти факторы могут приводить к внутривидовым вариациям, дифференциальному воздействию и ответной реакции, способствуя значительной изменчивости, наблюдаемой в некоторых параметрах в загрязненных районах [88–90]. Загрязняющие вещества могут вызывать кумулятивные эффекты и/или подвергаться взаимодействиям между ними. Свободноживущие популяции, хронически подверженные загрязнению, используют адаптивные процессы, чтобы лучше переносить токсичные вещества в изменяющейся окружающей среде [90–92]. Все эти факторы могут усложнить интерпретацию экотоксикологических данных, поскольку некоторые параметры часто не демонстрируют статистической значимости, а только тенденции к увеличению/уменьшению. Комбинированный подход, подобный описанному в настоящем исследовании, чрезвычайно важен для более широкого и точного представления о последствиях загрязнения окружающей среды и ее компонентов.

### **Выводы**

Морфогистоструктура печени копытных семейства оленевых может служить индикатором качества окружающей природной среды и благополучия популяций. В качестве индикаторов пригодны показатели структуры и размеров печеночных балок, кровеносных сосудов (синусоидных капилляров, поддольковых и центральных вен), междольковой соединительной ткани, наличие и количественные показатели очагов некроза, воспалений, фиброзных преобразований, стеатоза, вакуолярных и лимфоидных изменений. На уровне клеток оцениваются количество в поле

зрения, структура, форма и соотношение одно-, двуядерных и гипертрофированных гепатоцитов, их ядер оболочки и цитоплазмы. Диагностическое значение могут также иметь показатели площади клеток, ядер, цитоплазмы, диаметра ядер, значение ядерно-цитоплазматического индекса.

На примере лани, пятнистого и благородного оленей показано наличие достоверных видовых различий по параметрам площади одноядерных гепатоцитов, площади и диаметра ядер гепатоцитов, площади цитоплазмы, ядерно-цитоплазматического индекса, ширине и площади кровеносных сосудов. Превышение доли двуядерных гепатоцитов у пятнистого оленя и лани говорит о усиленной регенерации тканей печени – эти виды либо более чувствительны к негативным воздействиям, либо имеют более интенсивные процессы регенерации. Повышенный ядерно-цитоплазматический индекс одноядерных гепатоцитов у этих видов говорит о высоком уровне метаболизма и компенсаторных реакциях. По ряду гистологических параметров есть основание предполагать наличие половозрастных отличий у всех исследованных видов, для подтверждения которых необходим сбор дополнительного материала.

Выявлена достоверная положительная взаимосвязь площади клетки и площади ядер, площади клетки и диаметра ядер, площади клетки и площади цитоплазмы одноядерных гепатоцитов. Значимую отрицательную корреляцию имеют площади цитоплазмы и ядерно-цитоплазматический индекс как одноядерных, так и двуядерных гепатоцитов.

У благородного, пятнистого оленей и лани, обитающих в различных природно-антропогенных комплексах, при гистологическом исследовании печени установлена сходная картина с присутствием патологических трансформаций, включая многочисленные некротические очаги, сопровождающиеся появлением двуядерных и гипертрофированных гепатоцитов, аномалиями структуры клеточных стенок, цитоплазмы и ядра. Выявлено нарушение структуры печеночных балок и микроциркуляции кровяного русла. Анализ совокупности морфогистологических параметров позволяет предположить, что вероятной причиной подобных изменений может быть паразитарная инвазия (фасциолез, эхинококкоз) или воздействие загрязняющих веществ. Осуществление комплекса ветеринарных и биотехнических мероприятий, направленных на совершенствование количественных и качественных параметров подкормки, оздоровление окружающей среды от инвазионного материала представляется на исследуемой территории крайне актуальным.

Полученные результаты направлены на решение актуальной научной проблемы оценки благополучия популяций хозяйственно важных видов животных в зависимости от условий окружающей природной среды. Создание системы экологического мониторинга, в котором дикие копытные могут рассматриваться как био-

логические индикаторы этой оценки, поможет усовершенствовать систему наблюдения за состоянием биоты и качественными параметрами охотничьих ресурсов. Подобные исследования необходимы для обоснования условий содержания копытных в неволе, соответствующих физиологическим требованиям их организма, обеспечивающих благополучие поголовья и высокое качество получаемой продукции.

Гистопатологическая оценка тканей, которой в настоящем исследовании выступает печень копытных семейства оленевых, является удобным биомаркером, представляющим важную качественную и количественную информацию об острых или хронических эффектах негативных воздействий, а полученные значения морфометрических показателей печени этих животных могут быть использованы для формирования референтных значений в градиенте норма – патология. Наши результаты предоставляют информацию, которая поможет при проведении патологоанатомических исследований диких и содержащихся на фермах оленей. Биомаркеры, использованные в настоящем исследовании, могут стать важным инструментом субклинической диагностики нарушений питания, поведения, токсикозов, паразитарных и других болезней у копытных, подверженных воздействию данных экологических факторов. При исследовании диких животных трудно подтвердить, были какие-либо гистопатологические поражения вызваны или усугублены воздействием токсикантов, гельминтов или стресса, эти факторы не следует исключать или упускать из виду при сборе биоматериала. Точный сэмплинг и архивирование образцов позволят нам накапливать материал и проводить комплексные исследования с применением современных инструментальных методов. Гистологические данные могут служить источником дополнительной, но очень важной информации для достоверной интерпретации результатов.

#### Критерии авторства

М. А. Перевозчикова – концептуализация, методология, верификация данных, формальный анализ,

проведение исследования, администрирование данных, создание черновика рукописи, создание рукописи и ее редактирование; И. И. Окулова – проведение исследования; А. А. Сергеев – верификация данных, создание рукописи и ее редактирование, визуализация, администрирование проекта, руководство исследованием, ответственность за управление и координацию планирования и осуществления научно-исследовательской деятельности, получение финансирования; И. А. Домский – руководство исследованием, ответственность за управление и координацию планирования и осуществления научно-исследовательской деятельности, получение финансирования; В. В. Ширяев – создание рукописи и ее редактирование; М. Г. Дворников – создание рукописи и ее редактирование; Б. Е. Зарубин – проведение исследования.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Contribution

M.A. Perevozchikova was responsible for the research concept, methodology, data verification, formal analysis, research, data administration, drafting, and proofreading; I.I. Okulova performed the research; A.A. Sergeyev was responsible for the data verification, drafting, proofreading, visualization, project administration, supervision, management, coordination, planning, and obtaining funds; I.A. Domskey was responsible for the supervision, management, coordination, planning, research activities, and obtaining funds; V.V. Shiryayev wrote and proofread the manuscript; M.G. Dvornikov wrote and proofread the manuscript; B.E. Zarubin performed the research.

#### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

#### References/Список литературы

1. Yegorova NYu, Solovyov VA, Sergeev AA, Shiryayev VV. Prospects of breeding ungulate animals kept in openair cage (aviary breeding) and some features of agricultural landscape management. *Dalnevostochnyj agrarnyj vestnik*. 2019;(4):54–59. <https://doi.org/10.24411/1999-6837-2019-14052>; <https://elibrary.ru/JWHJEB>
2. Danilkin AA. Wild ungulates in hunting: Basic resource management. Moscow: GEOS. 2006. 366 p. (In Russ.). [Данилкин А. А. Дикие копытные в охотничьем хозяйстве (основы управления ресурсами). М.: ГЕОС, 2006. 366 с.]
3. Savenko VS. Geochemical view on biological evolution: natural selection at the level of biogeocenoses. *International Conference Proceedings, 2006; Smolensk; 2006. p. 28–29. (In Russ.)*. [Савенко В. С. Геохимический взгляд на биологическую эволюцию: естественный отбор на уровне биогеоценозов // Доклады международной конференции. Смоленск, 2006. С. 28–29.]
4. Tyutikov SF. Biological monitoring. Wild animals as biogeochemical indicators. Moscow: Urait; 2022. 230 p. (In Russ.). [Тютиков С. Ф. Биологический мониторинг. Использование диких животных в биогеохимической индикации. М.: Юрайт, 2022. 230 с.]

5. Tripodi MA, Andrioli NB, Suárez OV. Genotoxicity evaluation using micronucleus test in *Rattus norvegicus* captured in urban ecosystems of Buenos Aires, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27:27626–27634. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08897-9>
6. Sánchez-Chardi A, Nadal J. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere*. 2007;68(4):703–711. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.042>
7. Lopes PA, Viegas-Crespo AM, Nunes AC, Pinheiro T, Marques C, Santos MC, et al. Influence of age, sex, and sexual activity on trace element levels and antioxidant enzyme activities in field mice (*Apodemus sylvaticus* and *Mus spretus*). *Biological Trace Element Research*. 2002;85(3):227–239. <http://doi.org/10.1385/BTER:85:3:227>
8. Świergosz-Kowalewska R, Bednarska A, Kafel A. Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere*. 2006;65(6):963–974. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.040>
9. Nunes AC, Mathias ML, Crespo AM. Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution*. 2001;113(1):87–93. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00159-7)
10. Reynolds KD, Schwarz MS, McFarland CA, McBride T, Adair B, et al. Northern pocket gophers (*Thomomys talpoides*) as biomonitors of environmental metal contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006;25(2):458–469. <https://doi.org/10.1897/05-130R1.1>
11. Rogival D, Scheirs J, De Coen W, Verhagen R, Blust R. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006;25(1):149–157. <https://doi.org/10.1897/04-659R1.1>
12. Akalaev RN, Stopnitsky AA, Aripkhodjaeva GZ, Saidova MK. Toxic liver damage in acute poisoning and endogenous intoxication (literature review). *The Bulletin of Emergency Medicine*. 2020;13(6):95–102. (In Russ.). [Токсические поражения печени при острых отравлениях и эндогенной интоксикации (обзор литературы) / Р. Н. Акалаев [и др.] // Вестник экстренной медицины. 2020. Т. 13. № 6. С.95–102.]. <https://elibrary.ru/POGNXX>
13. Damek-Poprawa M, Sawicka-Kapusta K. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research*. 2004;96(1):72–78. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.02.003>
14. Pereira R, Pereira ML, Ribeiro R, Gonçalves F. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environmental Pollution*. 2006;139(3):561–575. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.04.038>
15. Sánchez-Chardi A, Ribeiro CAO, Nadal J. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere*. 2009;76(3):387–394. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.036>
16. Nur ARN, Yuli HE, Maftuch. Analysis of histopathology and heavy metals contents of cadmium (Cd) in *Tilapia (Oreochromis niloticus)* in downstream at the Rejoso River of Pasuruan Regency, East Java, Indonesia. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2021;11(119):220–228. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2021-11.25>
17. Fazlieva AS, Karimov DO, Daukaev RA, Kurilov MV, Ziatdinova MM, Valova YV, et al. Accumulation of cadmium in organs of experimental animals and its effect on the content of essential elements in the chronic intoxication. *Hygiene and Sanitation, Russian Journal*. 2021;100(11):1303–1339. (In Russ.). <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-11-1303-1309>; <https://elibrary.ru/NGZHSI>
18. Abdel-Halim KY. Biomarkers in Ecotoxicological Research Trails. *Journal of Forensic Science and Toxicology*. 2018;1(1):1005.
19. Laishev KA, Samandas AM, Prokudin AV, Romanenko TM, Goncharov VV, Muhamadeeva TV. Veterinary and zootechnical problems of reproduction in the northern reindeer and their solutions. *Achievements of Science and Technology of AICis*. 2013;(11): 42–45. (In Russ.). [Ветеринарные и зоотехнические проблемы воспроизводства в северном оленеводстве и пути их решения / К. А. Лайшев [и др.] // Достижения науки и техники АПК. 2013. № 11. С. 42–45.]. <https://elibrary.ru/rkncsr>
20. Novak GV. Morphological characteristics of the liver and spleen of reindeer after different types of feeding during Yamal winter. *Cand. Veterinary Sci. Diss. Ufa: Bashkir State Agrarian University*; 2016. 136 p. (In Russ.). [Новак Г. В. Морфологическая характеристика печени и селезенки северных оленей при содержании на разных типах кормления в зимний период в условиях Ямала: дис. ... канд. ветеринар. наук. Уфа. 2016. 136 с.]. <https://elibrary.ru/ZQIGWH>
21. Parker KL, Barboza PS, Gillingham MP. Nutrition integrates environmental responses of ungulates. *Functional Ecology*. 2009;23(1):57–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01528.x>
22. Davydova YuA, Nesterkova DV, Mukhacheva SV. Hepatocytes of the European mole, bank vole, and pygmy wood mouse. In: Rozenberga GS, editor. *Theoretical issues of ecology and evolution: 6th Lyubishchev Readings, 11th All-Russian population seminar and the All-Russian seminar in Homeostatic mechanisms of biological systems: Population ecology*. Tolyatti: Cassandra; 2015. pp. 110–113. (In Russ.). [Давыдова Ю. А., Нестеркова Д. В., Мухачева С. В. Особенности гепатоцитов

европейского крота, рыжей полевки и малой лесной мыши // Теоретические проблемы экологии и эволюции: Шестые Люблинские чтения, 11-й Всероссийский популяционный семинар и Всероссийский семинар «Гомеостатические механизмы биологических систем» с общей темой «Проблемы популяционной экологии» / Под ред. Г. С. Розенберга. Тольятти: Кассандра, 2015. С. 110–113.]. <https://elibrary.ru/WFUNKT>

23. Parra CA, Duarte A, Luna RS, Wolcott DM, Weckerly FW. Body mass, age, and reproductive influences on liver mass of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Canadian Journal of Zoology*. 2014;92(4):273–278. <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0201>

24. Borges EM, Machado MRF, Oliveira FS, de Souza WM, Duarte JMB. Aspectos morfológicos do fígado do cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2002;39(2):78–80. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000200004>

25. Zitare I, Pilmane M, Jemeljanovs A. Histomorphology of the digestive system of red deer (*Cervus elaphus* L.) in Latvia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 2013;5(4):99–106. <https://doi.org/10.5897/JVMAH12.036>.

26. Montanholi YR, Haas LS, Swanson KC, Coomber BL, Yamashiro S, Miller SP. Liver morphometrics and metabolic blood profile across divergent phenotypes for feed efficiency in the bovine. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2017;59:24. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0292-1>

27. Bezel VS. Ecological toxicology: population and biocenotic aspects. Yekaterinburg: Goshchikiy; 2006. 280 p. (In Russ.). [Безель В. С. Экологическая токсикология: популяционный и биоценотический аспекты. Екатеринбург: Гошкин, 2006. 280 с.].

28. Ivanter EV, Medvedev NV. Ecological toxicology of natural populations of birds and mammals of the North. Moscow: Science; 2007. 229 с. (In Russ.). [Ивантер Э. В., Медведев Н. В. Экологическая токсикология природный популяций птиц и млекопитающих Севера. М.: Наука, 2007. 229 с.].

29. Sanchez-Chardi A, Marques CC, Gabriel SI, Capela-Silva F, Cabrita AS, Lopez-Fuster MJ, et al. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environmental Pollution*. 2008;156(3):1332–1339. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.02.026>

30. Shvarts SS, Smirnov VS, Dobrinskiy LN. Method of morphophysiological indicators in ecology of terrestrial vertebrates. *Proceedings of the Institute of Plant and Animal Ecology of the Ufa Branch of the USSR Academy of Sciences. Sverdlovsk*. 1958. 390 p. (In Russ.). [Шварц С. С., Смирнов В. С., Добринский Л. Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных // Труды Института экологии растений и животных УФ АН СССР. Свердловск. 1958. Вып. 58. 390 с.].

31. Myadelets OD, Lebedeva EI. Functional morphology and elements of general liver pathology. Vitebsk: VSMU; 2018. 339 p. (In Russ.). [Мяделец О. Д., Лебедева Е. И. Функциональная морфология и элементы общей патологии печени. Витебск: ВГМУ, 2018. 339 с.]. <https://elibrary.ru/YXKBZJ>

32. Murzina SA, Nefedova ZA, Pekkoeva SN, Nemova NN. Histomorphological structure of the liver in roach (*Rutilus rutilus*) and pike (*Esox lucius*) from lakes with different levels of anthropogenic impact. *Ekologia*. 2014;45(2):143–149. (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S036705971402005X>; <https://elibrary.ru/RWZVTF>

33. Damek-Poprawa M, Sawicka-Kapusta K. Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. *Toxicology*. 2003;186:(1-2):1–10. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00595-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00595-4)

34. Mavlikeev MO, Kiyasov AP, Deev RV. Histological technique in a pathomorphological laboratory. Moscow: Practical medicine. 2023; 112 p. (In Russ.). [Мавликеев М. О., Киясов А. П., Деев Р. В. Гистологическая техника в патоморфологической лаборатории. М.: Практическая медицина, 2023. 112 с.].

35. Semchenko VV, Barashkova SA, Nozdrin VN, Artemev VN. Histological technique. Omsk-Orel: Omsk Regional Publishing House; 2006. 290 p. (In Russ.). [Гистологическая техника / В. В. Семченко [и др.]. Омск-Орел: Омская областная типография, 2006. 290 с.].

36. Veremeeva SA, Krasnolobova EP, Ivanyushina AM. On the issue of morphological and histological features of the internal organs of the siberian roe deer. *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2023;(8):57–64. (In Russ.). <https://doi.org/10.53083/1996-4277-2023-226-8-57-64>; <https://elibrary.ru/DBXXHA>

37. Malofeev YuM, Ryadinskaya NI, Chebakov SN. Morphology of marals (*Cervus Elapus Sibiricus Severtsov*). Barnaul: AGAU; 2014. 390 p. (In Russ.). [Малофеев Ю. М., Рядинская Н. И., Чебаков С. Н. Морфология марала (*Cervus Elapus Sibiricus Severtsov*). Барнаул: АГАУ, 2014. 390 с.].

38. Kuznetsov DN, Romashova NB, Romashov BV. Gastrointestinal nematodes of European roe deer (*Capreolus Capreolus*) in Russia. *Russian Journal of Theriology*. 2020;19(1):85–93. <https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.19.1.09>; <https://elibrary.ru/URJYCK>

39. Barrett KE. Functional anatomy of the liver and biliary system. In: Raff H, Levitzky MG, editors. *Medical physiology: A systems approach*. McGraw-Hill Professional Publishing New York, USA, 2011. pp. 559–565.

40. Ivanter EV, Korosov AV. Basic biometrics. Petrozavodsk: PetrGU; 2005. 104 p. (In Russ.). [Ивантер Э. В., Коросов А. В. Элементарная биометрия. Петрозаводск: ПетрГУ, 2005. 104 с.].

41. Zaitoun AA, Path FRC, Apelqvist G, Al-Mardini HA, Gray T, Bengtsson F, Record CO. Quantitative studies of liver atrophy after portacaval shunt in the rat. *Journal of Surgical Research*. 2006;131(2):225–232. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.11.587>
42. Fedyuk VI, Kazakov DN. Cytological aspects of diagnostics of liver diseases in dogs. *Praktik*. 2003;(7-8):98–101. (In Russ.). [Федюк В. И., Казаков Д. Н. Цитологические аспекты диагностика заболеваний печени у собак // Практик. 2003. № 7-8. С. 98–101.]
43. Avtandilov GG. Basics of quantitative pathological anatomy. Moscow: Medicine; 2002. 327 p. (In Russ.). [Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. М.: Медицина, 2002. 327 с.]
44. Bergmane B, Bērziņa D, Visocka A. Histopathological changes in liver of elks with *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* invasion. *Research for rural development*. 2019;1:262–264. <https://doi.org/10.22616/rrd.25.2019.040>
45. Filip KJ, Pyziel AM, Demiaszkiewicz AW. A massive invasion of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* in elk (*Alces alces*) in Lublin Province, Poland. *Annals of Parasitology*. 2016;62(2):107–110. <https://doi.org/10.17420/ap6202.40>
46. Rehbein S, Visser M. Sika Deer (*Cervus nippon*) are not “Dead-End Hosts” of the Giant Liver Fluke, *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917. *Journal of Wildlife Diseases*. 2022;58(1):194–197. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-21-00004>
47. Matsuda K, Kogame S, Niki H, Saito M, Ishiguro Y, Sano Y. Gross and histological lesions in the livers of sika deer with particular emphasis on fascioliasis. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2020. 82(2):125–134. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0544>
48. Cullen JM, Stalker MJ. Liver and biliary system. In: Maxie MG, editors. *Jubb, Kennedy, Palmer’s Pathology of Domestic Animals: Volume 2 (Sixth Edition)*. Elsevier, Canada. 2016. pp. 258–352. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5318-4.00008-5>
49. Zaki SR, Alves VAF, Hale GL. Non-hepatotropic viral, bacterial, and parasitic infections of the liver. In: Burt AD, Ferrell LD, Hübscher SG, editors. *MacSween’s Pathology of the Liver*. Elsevier, Philadelphia. 2024. pp. 448–526. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-8228-3.00007-7>
50. Quaglia A, Roberts EA, Torbenson M. Developmental and inherited liver disease. In: Burt AD, Ferrell LD, Hübscher SG, editors. *MacSween’s Pathology of the Liver*, 7th ed. Elsevier, Philadelphia. 2018. pp. 111–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6697-9.00003-0>
51. Lamb J, Doyle E, Barwick J, Chambers M, Kahn L. Prevalence and pathology of liver fluke (*Fasciola hepatica*) in fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary Parasitology*. 2021;293:109427. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109427>
52. Karimov F, Skovorodin E, Gimranov V, Bagautdinov A, Zhukov A. Pathomorphological and Morphometric Studies of Bovine Liver Infected with Fascioles. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2021;9(3):372–378. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.3.372.378>
53. Skovorodin E, Bronnikova G, Bazekin G, Dyudbin O, Khokhlov R. Antioxidant influence on poultry liver morphology and hepatocyte ultrastructure. *Veterinary World*. 2019;12(11):1716–1728. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1716-1728>
54. Sarkari B, Rezaei Z. Immunodiagnosis of human hydatid disease: Where do we stand? *World Journal of Methodology*. 2015;5(4):185–195. <https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i4.185>
55. Pawłowski ZS, Eckert J, Vuitton DA, Ammann RW, Kern P, Craig PS, et al. Echinococcosis in humans B.: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin F-X, Pawłowski ZS, editors. *WHO/OIE manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern*. Paris: World Organization for Animal Health; 2001. pp. 20–69.
56. Çelebi Eroğlu A, Oruç E. Pathomorphological examination of hydatid cyst in lungs and livers of cattles slaughtered in a commercial abattoir in Eskisehir. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*. 2023;8(2):61–68. <https://doi.org/10.24880/maevufd.1180622>
57. Damek-Poprawa M, Sawicka-Kapusta K. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research*. 2004;96(1):72–78. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.02.003>
58. Jadhav SH, Sarkar SN, Aggarwal M, Tripathi HC. Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats sub-chronically exposed to a mixture of eight metals found as groundwater contaminants in different parts of India. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2007;52:145–151. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0053-z>
59. Cygan-Szczegielniak D, Stasiak K. Effects of age and sex on the content of heavy metals in the hair, liver and the *longissimus lumborum* muscle of roe deer *Capreolus capreolus* L. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022; 29:10782–10790. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16425-6>
60. Kasperczyk S, Błaszczak I, Dobrakowski M, Romuk E, Kapka-Skrzypczak L, Adamek M, et al. Exposure to lead affects male biotransformation metabolism. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2013;20(4):721–725.
61. Zhai H, Chen C, Wang N, Chen Y, Nie X, Han B, et al. Blood lead level is associated with non-alcoholic fatty liver disease in the Yangtze River Delta region of China in the context of rapid urbanization. *Environmental Health*. 2017;16:93. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0304-7>

62. Page-Karjian A, Lo CF, Ritchie B, Harms CA, Rotstein DS, Han S, *et al.* Anthropogenic Contaminants and Histopathological Findings in Stranded Cetaceans in the Southeastern United States, 2012–2018. *Frontiers in Marine Science*. 2020;7:630. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00630>
63. Omotoso BR, Abiodun AA, Ijomone OM, Adewole SO. Lead-induced damage on hepatocytes and hepatic reticular fibres in rats; protective role of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves (lam). *Journal of Biosciences and Medicines*. 2015;3:27–35. <https://doi.org/10.4236/jbm.2015.35004>
64. El-belbasy HI, Hussein MA, Alghitany MEM. Potential effects of cranberry extract against lead acetate-induced hepato-renal toxicity in rats. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2021;9(10):1669–1683. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.10.1669.1683>
65. Howerth EW, Nemeth NM, Ryser-Degiorgis MP. Cervidae. In: Terio KA, McAloose D, St Leger J, editors. *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*. Elsevier academic Press. 2018. pp. 149–184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805306-5.00047-X>
66. Jota Baptista C, Oliveira PA, Gonzalo-Orden JM, Fernandes G, Seixas F. Histopathology lesions in red deer (*Cervus elaphus*) from Idanha-a-Nova and Lousã (Portugal): preliminary results. *Veterinarska Stanica*. 2024;55(2):137–145. <https://doi.org/10.46419/vs.55.2.2>
67. Beiglböck C, Steineck T, Tataruch F, Ruf T. Environmental cadmium induces histopathological changes in kidneys of roe deer. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002;21(9):1811–1816. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210908>
68. García-Márquez LJ, Ramírez-Romero R, Martínez-Burnes J, López-Mayagoitia A, Ruiz-Ramírez JA, Loman-Zúñiga EI, *et al.* Ataxia enzoótica por deficiencia de cobre en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) cautivo en Colima, México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*. 2022;12(4):1326–1337. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i4.5750>
69. Peet RL, Hepworth K. Enzootic ataxia in red deer, *Cervus elaphus*. *Australian Veterinary Journal*. 1993;70(10):395–396. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb00828.x>
70. Vengust G, Svava T, Gombac M, Zele D. Enzootic ataxia associated with copper deficiency in a farmed red deer: a case report. *Veterinarni Medicina*. 2015;60(9):522–526. <https://doi.org/10.17221/8444-VETMED>
71. Josefsen TD, Sorensen KK, Mork T, Mathiesen SD, Ryeng KA. Fatal inanition in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*): pathological findings in completely emaciated carcasses. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2007;49(1):27. <https://doi.org/10.1186%2F1751-0147-49-27>
72. de Oliveira AR, dos Santos DO, Pereira MdePM, de Carvalho TF, Tinoco HP, Pessanha AT, *et al.* A retrospective study of hepatic hemosiderosis and iron storage disease in several captive and free-ranging avian species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2022;53(2):455–460. <https://doi.org/10.1638/2021-0130>
73. Burkhead JL, Collins JF. Nutrition Information Brief – Copper. *Advances in Nutrition*. 2022;13(2):681–683. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab157>
74. Harvey JW. Iron metabolism and its disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 2008. pp. 259–286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00009-X>
75. Kreutzer KV, Turk JR, Casteel SW. Clinical Biochemistry in Toxicology. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 2008. pp. 821–837. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00029-5>
76. Belykh AE, Bobyntsev II, Dudka VT, Kryukov AA. Rats' liver morphology in conditions of chronic foot-shock stress against the background of delta sleep-inducing peptide injection. *Modern Problems of Science and Education*. 2017; (1):47. (In Russ.). [Морфология печени крыс в условиях хронического эмоционально-болевого стресса на фоне введения дельта-сон индуцирующего пептида / А. Е. Белых [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 1. С. 49.]. <https://elibrary.ru/XXNCEJ>
77. Gusakova EA, Gorodetskaya IV. Influence of iodine-containing thyroid hormones on the liver histological structure of rats in stress. *Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2013;12(4):5–13. (In Russ.). [Гусакова Е. А., Городецкая И. В. Влияние йодсодержащих тиреоидных гормонов на гистоструктуры печени крыс при стрессе // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2013. Т. 12. № 4. С. 5–13.]. <https://elibrary.ru/RVZEJD>
78. Litvinenko AN, Zinovkin DA, Ugolnik TS. Morphologic and morphometric parameters of the liver tissue of laboratory animals after modeling of chronic stress. *Health and Ecology Issues*. 2018;(4):56–60. (In Russ.). [Литвиненко А. Н., Зиновкин Д. А., Угольник Т. С. Морфологические и морфометрические параметры ткани печени лабораторных животных после моделирования хронического стресса // Проблемы здоровья и экологии. 2018. № 4. С. 56–60.]. <https://elibrary.ru/YROLED>
79. Solin AV, Lyashev YD. The influence of opioid peptides on morphological changes in the liver of rats exposed to prolonged stress. *Applied and It Research in Medicine*. 2016; 19(4):132–137. (In Russ.). [Солин А. В., Ляшев Ю. Д. Влияние опиоидных пептидов на морфологические изменения в печени крыс при длительном стрессе // Прикладные информационные аспекты медицины. 2016. Т. 19. № 4. С. 132–137.]. <https://www.elibrary.ru/XEOHTR>
80. Shepeleva OM, Bobyntsev YaI. Effect of the peptide ACTH4-7-PGP (Semax) on lipid peroxidation and the state of the liver antioxidant system during acute and chronic immobilization stress. *Materials X International Scientific Conference of the Young Scientist in Medicine*. Kursk: Kursk State Medical University; 2016. pp. 445–448. (In Russ.).

[Шепелева О. М., Бобынцев Я. И. Влияние пептида АКТГ4-7-ПГП (Семакса) на перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы печени при остром и хроническом иммобилизационном стрессе // Материалы X юбилейной международной научно-практической конференции молодых ученых-медиков. Курск, 2016. С. 445–448.]. <https://elibrary.ru/WATKZD>

81. Romanova LP, Malyshev II. The role of binuclear hepatocytes in liver regeneration after a mechanical trauma in early ontogenesis in rats. Vestnik Chuvashskogo Universiteta. 2011;3:398–402. (In Russ.). [Романова Л. П., Малышев И. И. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс // Вестник Чувашского университета. 2011. № 3. С. 398–402.]. <https://elibrary.ru/ODANWR>

82. Skuratov AG, Lyzikov AN, Zinovkin DA, Cheshik IA, Petrenyov DR. Morphometric parameters of liver regeneration in case of partial hepatectomy and mesenchymal stem cells transplantation in experiment. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medicine Series. 2016;4:57–65. (In Russ.). [Морфометрические параметры регенерации печени при частичной гепатэктомии и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте / А. Г. Скуратов [и др.] // Вестник национальной академии науки Беларуси. Серия медицинских наук. 2016. № 4. С. 57–65.] <https://elibrary.ru/XDDCSF>

83. Andersen KJ, Knudsen AR, Wiborg O, Mortensen FV. Chronic stress does not impair liver regeneration in rats. Regenerative Medicine Research. 2015;3:2. <https://doi.org/10.1186/s40340-015-0011-8>

84. Zacs D, Rjabova J, Ikkere LE, Bavrin K, Bartkevics V. Brominated flame retardants and toxic elements in the meat and liver of red deer (*Cervus elaphus*), wild boar (*Sus scrofa*), and moose (*Alces alces*) from Latvian wildlife. Science of The Total Environment. 2018;621:308–316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.247>

85. Jadhav SH, Sarkar SN, Aggarwal M, Tripathi HC. Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats sub-chronically exposed to a mixture of eight metals found as groundwater contaminants in different parts of India. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2007;52:145–151. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0053-z>

86. Thijssen S, Maringwa J, Faes C, Lambrechts I, Van Kerkhove E. Chronic exposure of mice to environmentally relevant, low doses of cadmium leads to early renal damage, not predicted by blood or urine cadmium levels. Toxicology. 2007;229(1-2):145–156. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.10.011>

87. Ivanova ES, Rumiantseva OY, Udodenko YG, Eltsova LS, Komov VT. Mercury content in the organs of small mammals in different geomorphological regions of the taiga zone of the European part of Russia. Ecosystem Transformation. 2023;6(5):118–133. (In Russ.). <https://doi.org/10.23859/estr-230717>; <https://elibrary.ru/THOWQE>

88. Petkovšek SAS, Kopušar N, Krystufek B. Small mammals as biomonitors of metal pollution: A case study in Slovenia. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 2014;186:4261–4274. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3696-7>

89. Sanchez-Chardi A, Lopez-Fuster MJ, Nadal J. Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): sex- and age-dependent variation. Environmental Pollution. 2007;145(1):7–14. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.02.033>

90. Marques CC, Sanchez-Chardi A, Gabriel SI, Nadal J, Viegas-Crespo AM, Mathias ML. How does the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, responds to long term heavy metal contamination? A case study. Science of the Total Environment. 2007;376(1-3):128–133. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.061>

91. Medina MH, Correa JA, Barata C. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. Chemosphere. 2007;67(11):2105–2114. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.024>

92. Wlostowski T, Krasowska A, Bonda E. An iron-rich diet protects the liver and kidneys against cadmium-induced injury in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2003;54(2):194–198. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00053-2)

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2543>  
<https://elibrary.ru/NHGDYD>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Закономерности массообменных процессов при криоконцентрировании обезжиренного молока



Е. В. Короткая<sup>1,\*</sup>, И. А. Короткий<sup>1</sup>,  
К. И. Васильев<sup>2</sup>, Д. А. Ефремов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кемеровский государственный университет<sup>ROR</sup>, Кемерово, Россия

<sup>2</sup> Кузбасский региональный институт развития профессионального образования  
им. А. М. Тулеева, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 22.06.2024

Принята после рецензирования: 06.08.2024

Принята к публикации: 03.09.2024

\*Е. В. Короткая: [korotkayael@mail.ru](mailto:korotkayael@mail.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-6210-3756>

И. А. Короткий: <https://orcid.org/0000-0002-7623-0940>

К. И. Васильев: <https://orcid.org/0009-0002-4184-1706>

Д. А. Ефремов: <https://orcid.org/0009-0004-6958-1250>

© Е. В. Короткая, И. А. Короткий, К. И. Васильев,  
Д. А. Ефремов, 2024



### Аннотация.

Криоконцентрирование молока и молочных продуктов является привлекательной альтернативой традиционным методам концентрирования (выпаривание, мембранные технологии) в силу минимального воздействия на нативные свойства и соизмеримых энергетических затрат. Изучение закономерностей массообменных процессов при криоконцентрировании молока позволило определить количество вымороженного льда на охлаждаемой поверхности в зависимости от времени, температуры и состава исходного сырья.

Объект исследования – обезжиренное молоко (массовая доля жира 0,05 %). С использованием стандартных методов анализа определяли основные физико-химические показатели молока: содержание воды, жира, белка, сухих веществ. Низкотемпературное концентрирование обезжиренного молока осуществляли в емкостном криоконцентраторе в течение 3 ч при различных температурах хладоносителя (–2, –4, –6, –8 °С). Температуру замерзания определяли с помощью хромель-копелевых термоэлектрических преобразователей. Кинетику низкотемпературного концентрирования изучали на разработанной экспериментальной лабораторной установке.

В результате исследования установили, что кривые скорости роста ледяной фракции при температурах в диапазоне от –2 до –8 °С схожи и носят нелинейный характер. При всех температурных режимах содержание сухих веществ повышалось с увеличением времени вымораживания и при снижении температуры хладоносителя. Получили уравнение регрессии для расчета массовой доли сухих веществ в концентрированном обезжиренном молоке в зависимости от температуры и времени вымораживания. Определили влияние температуры и продолжительности вымораживания на степень перехода сухих веществ молока во фракцию льда.

Наибольшее влияние на процесс криоконцентрирования обезжиренного молока оказывала температура хладоносителя. Однако ее снижение привело не только к увеличению содержания сухих веществ в готовом продукте, но и значительно увеличило степень перехода сухих веществ в лед. Оптимальная температура для концентрирования молока в кристаллизаторе емкостного типа составила –4 °С.

**Ключевые слова.** Обезжиренное молоко, криоконцентрирование, сухие вещества, температура замерзания, кинетика кристаллизации, разделительное вымораживание, криоскопическая температура

**Финансирование.** Работа выполнена на базе кафедры теплохладотехники Кемеровского государственного университета<sup>ROR</sup>.

**Для цитирования:** Закономерности массообменных процессов при криоконцентрировании обезжиренного молока / Е. В. Короткая [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 781–793. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2543>

## Mass Transfer Patterns during Low-Temperature Concentration of Skim Milk



Elena V. Korotkaya<sup>1,\*</sup>, Igor A. Korotkiy<sup>1</sup>,  
Kirill I. Vasiliev<sup>2</sup>, Denis A. Efremov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kemerovo State University<sup>OR</sup>, Kemerovo, Russia

<sup>2</sup> Kuzbass Regional Institute of Professional Education Development, Kemerovo, Russia

Received: 22.06.2024

Revised: 06.08.2024

Accepted: 03.09.2024

\*Elena V. Korotkaya: [korotkayael@mail.ru](mailto:korotkayael@mail.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-6210-3756>

Igor A. Korotkiy: <https://orcid.org/0000-0002-7623-0940>

Kirill I. Vasiliev: <https://orcid.org/0009-0002-4184-1706>

Denis A. Efremov: <https://orcid.org/0009-0004-6958-1250>

© E.V. Korotkaya, I.A. Korotkiy, K.I. Vasiliev, D.A. Efremov, 2024



### Abstract.

Low-temperature concentration of milk and dairy products is a prospective alternative to such traditional concentration methods as evaporation or membrane technologies. This energy-effective method preserves the native properties of dairy raw materials. In this research, the kinetics of moisture freezing made it possible to determine the effect of time, temperature, and composition on the amount of frozen ice on the cooled surface.

The study featured the main physical and chemical parameters of milk, i.e., water, fat, protein, and solids. Chromel-copel thermoelectric converters were used to identify the freezing temperature. Experimental laboratory equipment made it possible to describe the kinetics of low-temperature concentration.

The ice growth rate curves were similar and not linear at temperatures between  $-2$  and  $-8^{\circ}\text{C}$ . At all temperature conditions, the solids increased together with the freezing time as the coolant temperature went down. The experiment yielded a regression equation that revealed the mass fraction of solids in concentrated skim milk depending on the temperature and freezing time. The temperature and freezing time affected the transition rate of milk solids into ice.

The coolant temperature had the greatest effect on the cryoconcentration of skim milk. When the temperature of the coolant was reduced from  $-2$  to  $-8^{\circ}\text{C}$ , it increased the share of solids in the finished product and sped up its transition into ice. The optimal temperature for milk concentration in the experimental capacitive-type crystallizer proved to be  $-4^{\circ}\text{C}$ .

**Keywords.** Skim milk, cryoconcentration, solids, low-temperature concentration, freezing point, crystallization kinetics, separation freezing, cryoscopic temperature

**Funding.** The research was performed on the premises of the Department of Heat and Refrigeration Engineering, Kemerovo State University<sup>OR</sup>.

**For citation:** Korotkaya EV, Korotkiy IA, Vasiliev KI, Efremov DA. Mass Transfer Patterns during Low-Temperature Concentration of Skim Milk. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):781–793. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2543>

### Введение

Обезвоживание молока и молочных продуктов является важным и необходимым этапом при производстве молочных продуктов. Дегидратация молока позволяет получать не только концентрированное молоко, но и существенно увеличить его хранимоспособность для резервирования сырья в летние месяцы при избыточном его производстве [1].

Молоко представляет собой полидисперсную гетерогенную систему. В непрерывной фазе – дисперсионной среде, основу которой составляет вода, присут-

ствует в виде эмульсии молочный жир, мицеллы белка в виде дисперсной фазы образуют с плазмой молока коллоидный раствор. В дисперсионной среде растворены углеводы, витамины и минеральные вещества [2].

Обезвоживание молока осуществляют преимущественно выпариванием [3, 4]. Таким способом содержание сухих веществ можно увеличить до 50 %, однако высокотемпературное воздействие приводит к изменению термолабильных компонентов молока. В наибольшей степени изменениям подвержены сывороточные белки, ферменты и некоторые витамины, что сказыв-

вается на биологической ценности, физико-химических и органолептических свойствах готового продукта. Несмотря на то что данный способ довольно просто реализуем, он является достаточно энергоемким. Энергетические затраты процесса определяются теплотой парообразования воды, удельная величина этого параметра составляет 2260 кДж/кг при температуре 100 °С. Рекомендуемый диапазон рабочих температур процесса, не приводящий к существенным структурным изменениям в молоке, составляет 50÷70 °С [4–6]. Реализация процесса в обозначенном температурном диапазоне возможна при использовании вакуум-выпарных установок. Осуществление технологического процесса в условиях пониженного давления (12÷34 кПа) требует значительно более сложной технической реализации, а также дополнительных энергетических затрат для создания и поддержания вакуума (абсолютное давление 10÷30 кПа). Теплота испарения с понижением температурного уровня процесса возрастает – в обозначенном диапазоне температур теплота парообразования составляет 2333÷2382 кДж/кг. Таким образом, при понижении давления энергетические затраты процесса возрастают [7].

Мембранные технологии используются в молочной промышленности с 1960-х гг. Их применяют для концентрирования, стерилизации и стандартизации молока и молочных продуктов и для выделения белков и жиров. Применение мембранных технологий, таких как ультра- и нанофильтрация, обратный осмос, позволяет сохранить основные компоненты молока, претерпевающие изменения при высокотемпературном воздействии. Достоинством мембранных технологий является возможность фракционирования молочного сырья с сохранением его пищевой и биологической ценности. На современном этапе большая часть мембран, а именно 2/3, применяются для переработки сывротки и только 1/3 – для переработки молока. При использовании полупроницаемых мембран удалось достичь содержания сухих веществ в концентрированном продукте лишь около 30 %. Данный метод требует меньших энергетических затрат, чем выпаривание, однако стоимость полупроницаемых мембран достаточно высока [8, 9]. Другим недостатком этого метода концентрирования является постоянное снижение производительности мембранной установки вследствие непрерывного образования на поверхности мембран осадка белка, что приводит к закупорке пор и, следовательно, требует промывки циркуляционного контура и полостей мембранного модуля [9]. Соблюдение технологического регламента эксплуатации мембранных систем хоть и позволяет значительно увеличить продолжительность их эксплуатации, постепенное снижение производительности мембран вследствие закупоривания растворенными в молоке компонентами является необратимым процессом. Это существенно ограничивает эффективность применения мембран для концентрирования, усложняет эксплу-

атацию мембранных систем, требует периодической замены мембран и обслуживания мембранных установок.

Технология низкотемпературного концентрирования жидких пищевых систем является привлекательной альтернативой стандартным методам концентрирования (выпаривание, мембранные технологии), применяемым на предприятиях пищевой промышленности. Это связано с незначительным влиянием на химический состав и свойства сгущаемых продуктов, в то время как энергетические затраты на проведение вымораживания значительно меньше, чем при вакуумном выпаривании, и сопоставимы с затратами в мембранных системах [8, 10–17].

Удельная теплота фазового перехода при кристаллизации воды составляла 334 кДж/кг, необходимо иметь в виду, что низкотемпературная система, реализующая процесс разделительного вымораживания, затрачивает энергию на перенос теплоты от объекта низкотемпературной обработки, в результате чего происходила кристаллизация влаги из раствора. Низкотемпературная система, реализующая подобный перенос теплоты, имеет эффективный холодильный коэффициент 2÷2,5. Реальные затраты энергии на кристаллизацию 1 кг воды будут, соответственно, в 2÷2,5 раза ниже удельной теплоты кристаллизации. Необходимо отметить, что для плавления кристаллизата не требуется дополнительных энергозатрат. Для этой цели достаточно теплоты конденсации, производимой низкотемпературной системой.

Концентрирование молока вымораживанием позволяет сохранить в нативном состоянии входящие в его состав летучие и термолабильные компоненты [11, 18]. Как отмечается в работе J. Sánchez и др. [19], органолептические свойства свежего обезжиренного молока и обезжиренного молока, полученного при восстановлении из сконцентрированного вымораживанием, имели близкие значения.

Низкотемпературное концентрирование жидких пищевых продуктов заключается в замораживании содержащейся в них свободной воды и последующем удалении кристаллов льда. Согласно J. Sánchez и др., существует три основных механизма образования кристаллов льда в молоке и жидких молочных продуктах при их замораживании [19]. Первый – «suspension crystallization» – состоящий из начальной стадии образования в жидком пищевом продукте зародышей кристаллов льда (нуклеация) и роста образовавшихся кристаллов на второй стадии. Второй способ представляет собой кристаллизацию содержащейся в пищевом продукте воды в виде слоя льда на холодной поверхности – «layer crystallization» [20–22]. Третий способ, известный как блочная кристаллизация (block crystallization), состоит в том, что полностью замороженный раствор размораживают и отделяют концентрат от ледяной фракции, используя гравитационное размораживание или другие методы, позволяющие увеличить эффективность разделения [23–25].

Описанные способы льдообразования различаются по тепловыделению (через слой льда или через раствор), скорости льдообразования (при кристаллизации на поверхности и блочной кристаллизации она выше, чем при образовании суспензии кристаллов льда в жидкости), чистоте образующего льда и используемому оборудованию [19, 25].

Кристаллизацию на поверхности часто применяли для концентрирования различных жидких пищевых продуктов, таких как фруктовые соки, молоко и молочные продукты, кровь животных, водные растворы [8, 10, 11, 13, 19, 24, 26–36].

Вымораживание влаги при низкотемпературном концентрировании зависит от следующих параметров: температура хладоносителя или теплообменной поверхности, на которой происходит кристаллизация влаги, площадь теплообменной поверхности, химический состав и концентрация растворимых компонентов [8, 13, 35, 36]. Анализ литературных источников показал, что особенности льдообразования при концентрировании обезжиренного молока в концентраторах емкостного типа изучены недостаточно.

Изучение кинетики низкотемпературного концентрирования позволяет более глубоко понять особенности и механизм льдообразования, определить одну из основных характеристик процесса вымораживания – изменение количества вымороженного льда на теплообменной поверхности в зависимости от времени, температуры и химического состава исходного сырья.

Исходя из вышесказанного, целью работы является изучение влияния температуры криоконцентрирования на скорость льдообразования и содержание сухих веществ в концентрированном обезжиренном молоке и установление оптимальной температуры криоконцентрирования обезжиренного молока в криоконцентраторах емкостного типа для уменьшения потерь сухих веществ в готовом продукте.

### Объекты и методы исследования

Объектом исследования выступало обезжиренное молоко (массовая доля жира 0,05 %) производства компании «Viola» (Россия), УНТ.

При выполнении исследований использовали следующие приборы и оборудование: лактоденсиметр для молока Funke Gerber (Германия), иономер АНИОН 4101 (Россия), спектрофотометр КФК-3-01 (Россия), вискозиметр Гепплера KF3.2 с падающим шариком Rheotest Medingen GmbH (Германия), анализатор белкового азота «Rapid N Cube» компании Elementer Analysensysteme, GmbH (Германия), шкаф сушильный Ulab UT-4620 (Россия), весы электронные Stegler BY-210 (Китай), лабораторный стенд для определения температуры замерзания (рис. 1), криоконцентратор емкостного типа (рис. 2) [37]. Внешний вид криоконцентратора показан на рисунке 3.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программных пакетов MS Office Excel, Mathcad 15.

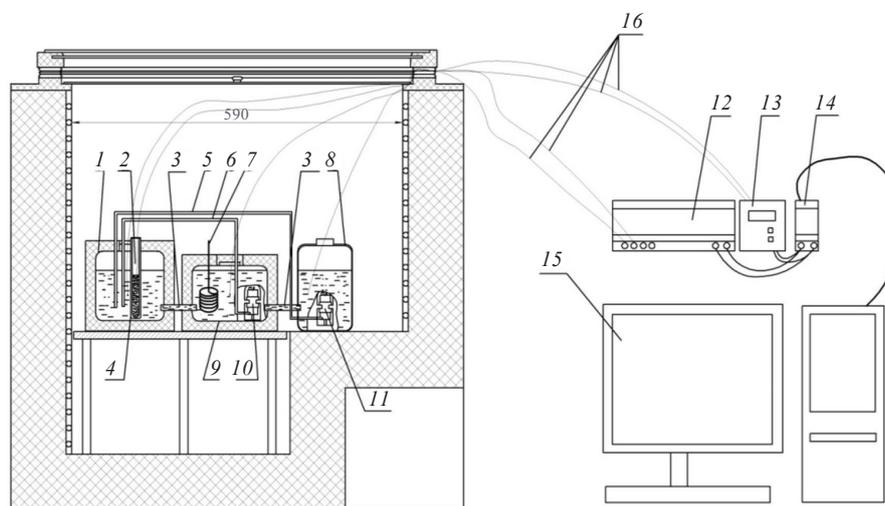


Рисунок 1. Схема лабораторного стенда для определения температуры замерзания. Лабораторный стенд состоит из рабочей емкости – 1; пробирки с исследуемым раствором – 2; уравнивающих трубопроводов – 3; цилиндрического сосуда – 4; трубопроводов для подачи хладоносителя – 5, 6; нагревателя – 7; емкости с холодным хладоносителем – 8; емкости для отепленного х/н – 9; насосов подачи отепленного – 10 и охлажденного хладоносителя – 11; аналогового модуля ввода МВА8 – 12; измерителя регулятора ТРМ202 – 13; преобразователя интерфейса АС4 – 14; компьютера – 15; хромель-копелевых термопар – 16

Figure 1. Equipment for laboratory determination of freezing point: a tank – 1; a test tube with test solution – 2; equalizing pipes – 3; a cylindrical vessel – 4; coolant-feeding pipes – 5, 6; a heater – 7; a tank with cold coolant – 8; a tank for heated coolant – 9; pumps that supply heat – 10 and cooled coolant – 11; an analog input module MBA8 – 12; a TRM202 controller meter – 13; an AC4 interface converter – 14; PC – 15; chromel-copel thermocouples – 16

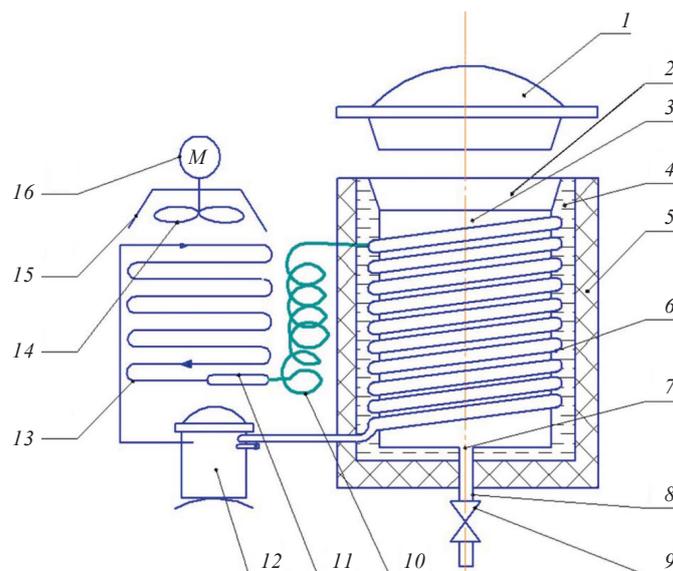


Рисунок 2. Схема криоконцентратора емкостного типа (емкость 3,5 л). Криоконцентратор состоит из теплоизолированной крышки – 1; заливной горловины – 2; цилиндрической емкости – 3, погруженной в хладоноситель – 4; теплоизоляции – 5; змеевика испарителя – 6; сливного отверстия – 7; трубопровода – 8; запорного вентиля – 9; капиллярной трубки – 10; фильтра осушителя – 11; компрессора – 12; воздушного конденсатора – 13; вентилятора – 14; кожуха – 15; электродвигателя вентилятора – 16

Figure 2. Capacitive 3.5-liter-cryoconcentrator: a heat-insulated lid – 1; a filler neck – 2; a cylindrical container – 3 immersed in coolant – 4; thermal insulation – 5; an evaporator coil – 6; a drain hole – 7; pipeline – 8; a shut-off valve – 9; a capillary tube – 10; a filter – 11; a compressor – 12; an air condenser – 13; a fan – 14 in casing – 15; a fan electric motor – 16

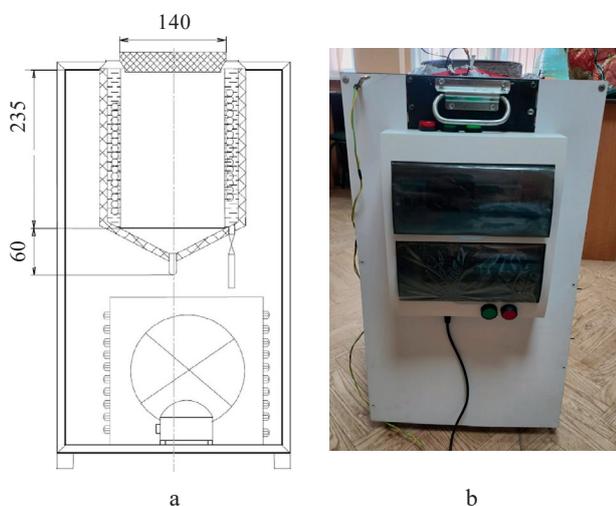


Рисунок 3. Конструкция криоконцентратора: а – схема устройства; б – внешний вид

Figure 3. Experimental cryoconcentrator: а – scheme; б – appearance

Плотность молока измеряли лактоденсиметром в  $\text{кг/м}^3$  при температуре  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , вязкость ( $\text{Па}\cdot\text{с}$ ) на вискозиметре Гепплера КФ3.2 с падающим шариком. Титруемую кислотность определяли потенциометрически по ГОСТ Р 54669-2011. Массовую долю влаги и сухих веществ в обезжиренном молоке, концентрированном

молоке и вымороженных фракциях определяли высушиванием при постоянной температуре  $(102 \pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$  по ГОСТ Р 54668-2011, содержание жира – кислотным методом по ГОСТ 5867-90. Массовую долю общего белка определяли методом Дюма на анализаторе белкового азота «Rapid N Cube». Перед определением лактозы из обезжиренного молока предварительно осаждали белок. Содержащуюся в водном экстракте пробы молока лактозу подвергали гидролизу в присутствии *b*-галактозидазы до глюкозы и галактозы. Находящуюся в пробе свободную галактозу и галактозу, образовавшуюся при гидролизе лактозы, окисляли под действием *b*-никотинамидадениндинуклеотида в присутствии *b*-галактозодегидрогеназы. Далее пробу фотометрировали при длине волны 365 нм. Массовую долю лактозы рассчитывали как разность оптических плотностей свободной галактозы и исследуемой пробы.

Температуру замерзания обезжиренного молока, полученного концентрированного молока и размороженных ледяных фракций определяли с использованием хромель-копелевых термопар на лабораторной установке, схема которой приведена на рисунке 1.

Низкотемпературное концентрирование обезжиренного молока проводили в двухцилиндровой разделительной вымораживающей установке с емкостью цилиндров 3,5 л [38].

На первом этапе исследования проводили определение основных физико-химических показателей молока, которые изменяются в результате концен-

трирования и способны повлиять на качественные показатели готового продукта.

На втором этапе осуществляли низкотемпературное концентрирование обезжиренного молока в емкостном криоконцентраторе (рис. 2, 3) в течение 3 ч при различных температурах хладоносителя –2, –4, –6, –8 °С. Измерение и контроль температуры осуществляли с помощью хромель-копелевых термопар, измерителя-регулятора ТРМ202, аналогового модуля ввода МВА8 и персонального компьютера. Вес вымороженного льда определяли на технических весах с точностью до 1 г.

На следующем этапе определяли температуру замерзания обезжиренного молока, концентрированного обезжиренного молока и размороженных ледяных фракций. Измерения проводили на лабораторной установке (рис. 1). В пробирку с исследуемым веществом устанавливали хромель-копелевые термоэлектрические преобразователи и погружали ее в емкость с хладоносителем. Показания температуры от термоэлектрических преобразователей фиксировали посредством универсального двухканального микропроцессорного регулятора марки ТРМ202 (рис. 1). Измеритель предварительно градуировали при температуре замерзания дистиллированной воды. Измерение проводили трехкратно, добиваясь, чтобы расхождение между предыдущим и последующим измерениями не превышало 0,1 °С. Изучили влияние содержания сухих веществ в молоке на изменение температуры замерзания.

На четвертом этапе изучили кинетику низкотемпературного концентрирования обезжиренного молока при температуре хладоносителя –2, –4, –6, –8 °С. Определяли содержание сухих веществ в молоке и вымороженных фракциях. Рассчитывали скорость роста сухих веществ в концентрате обезжиренного молока. Определяли содержание сухих веществ в вымороженной фракции. Устанавливали оптимальную температуру разделительного вымораживания обезжиренного молока в кристаллизаторе емкостного типа, принимая за основной критерий оптимизации минимальные потери сухих веществ.

### Результаты и их обсуждение

Как объект замораживания молоко имеет ряд специфических особенностей, обусловленных его химическим составом, физико-химическими и теплофизическими свойствами. Молоко представляет собой сложную полидисперсную систему, состоящую из истинного раствора (содержащего лактозу, минеральные вещества, микроэлементы и водорастворимые витамины) эмульсии типа «масло в воде» (дисперсная фаза которой представлена жиром, фосфолипидами, стеринами) и истинно коллоидного раствора белковых веществ. Молочный жир в эмульгированном состоянии находится в плазме молока в виде мелких капель (шариков), размер которых составляет от 0,1 до 10 мкм. Оболочка молочного жира является биологической

мембраной, состоящей из белков (гликопротеинов, бутирофилина и фермента ксантиноксидазы), фосфо- и гликолипидов, толщина которой составляет порядка 10 нм. Находящиеся на поверхности оболочки жира фосфолипиды и гликолипиды содержат полярные группы, способствующие образованию гидратной оболочки, и тем самым стабилизируют эмульсию. При разделительном вымораживании растущий фронт кристаллизации захватывает влагу гидратных оболочек шариков жира, и в результате некоторая часть молочного жира оказывается в вымороженной фракции. Медленное замораживание является необходимым условием реализации процессов криоконцентрирования, оно сопровождается разрушением гидратной оболочки жировых шариков, в результате чего система теряет агрегативную устойчивость. Вследствие этого происходит коалесценция жировых шариков, это вызывает дестабилизацию эмульсии и образование свободного жира. Помимо этого, при замораживании возможно удаление гидратационной воды из коллоидных частиц белка, что приведет к обезвоживанию мицелл казеина, потери их стабильности и снижению качества концентрированного молока.

При достижении криоскопической температуры начинается фазовый переход воды в лед, при этом вымораживается, согласно классификации Ребиндера, физико-химически связанная вода. Исходя из этого, изучение химического состава молока, а именно содержания сухих веществ, истинно растворимых составных частей молока и воды, имеет первостепенное значение. В таблице 1 приведены значения физико-химических показателей исследуемого обезжиренного молока.

На долю растворимых сухих веществ в обезжиренном молоке приходится 62,6 %, основную часть из которых составляет лактоза – 86,2 или 54,0 % от общего содержания сухих веществ, массовая доля белка в составе сухих веществ – 36,8 %.

Основываясь на результатах ранее проведенных исследований, низкотемпературное концентрирование обезжиренного молока проводили при темпера-

Таблица 1. Физико-химические показатели обезжиренного молока (n = 3)

Table 1. Physicochemical parameters of skim milk (n = 3)

Наименование показателя	Значение показателя
Массовая доля воды, %	91,30 ± 0,20
Массовая доля сухих веществ, %	8,70 ± 0,20
Массовая доля жира, %	0,05 ± 0,01
Массовая доля белка, %	3,20 ± 0,20
Массовая доля лактозы, %	4,70 ± 0,10
Массовая доля минеральных веществ, %	0,75 ± 0,30
Титруемая кислотность, °Т	17,50 ± 0,20
Плотность, кг/м <sup>3</sup>	1032 ± 1,00
Температура замерзания, °С	–0,50 ± 0,05
Вязкость, мПа·с	1,72 ± 0,02

турных режимах  $-2$ ,  $-4$ ,  $-6$  и  $-8$  °С в течение 3 ч [35]. Контролировали изменение следующих параметров: температура хладоносителя (водный раствор пропиленгликоля), температура вымораживания, количество вымороженной воды, содержание сухих веществ. Равномерное охлаждение объекта с постоянной скоростью обеспечивалось поддержанием заданной разности температур между исследуемым раствором и хладоносителем. Результаты изменения массы ледяной фракции и скорости льдообразования в зависимости от температуры хладоносителя и времени вымораживания представлены на рисунке 4.

Анализ полученных зависимостей показывает, что кривые увеличения массы ледяной фракции при всех температурных режимах имеют нелинейный характер и практически идентичны друг другу. Кривые скорости роста ледяной фракции, полученные методом графического дифференцирования, носят нелинейный характер и имеют схожий вид при температурах хладоносителя  $-4$ ,  $-6$  и  $-8$  °С. При этих температурах наблюдается резкое увеличение скорости льдообразования в начальный момент времени. Затем скорость льдообразования постепенно снижается, переходя практически в линейную зависимость. Максимальная скорость роста ледяной фракции отмечена в начальный момент времени (через 15–17 мин от начала процесса), когда разница температур обезжиренного молока и теплообменной поверхности наибольшая. Дальнейшее снижение скорости роста ледяной фракции объясняется образованием слоя льда на теплообменной поверхности и увеличением термического сопротивления.

При температуре  $-2$  °С кривая скорости роста ледяной фракции имеет более пологий вид на начальном участке. Такую зависимость можно объяснить тем, что при данной температуре скорость охлаждения молока будет небольшой и потому потребуются гораздо больше времени для начала процесса льдообразования. Таким образом, снижение температуры хладоносителя на каждые 2 °С в диапазоне от  $-4$  до  $-8$  °С в первые 15 мин способствует увеличению скорости роста ледяной фракции в 1,6 раза.

Важным моментом при осуществлении разделительного вымораживания является определение температуры начала кристаллизации, которая зависит от содержания сухих веществ в обезжиренном молоке. Исходное обезжиренное молоко криоконцентрировали в течение 3 ч при температуре  $-4$  °С и получили концентрированное обезжиренное молоко и вымороженную фракцию льда. Затем исследовали процесс охлаждения и определили температуру начала кристаллизации для исходного обезжиренного молока, концентрированного обезжиренного молока и фракции льда на лабораторной установке (рис. 1). Охлаждение исследуемых образцов осуществлялось хладоносителем. Разность температур между хладоносителем и исследуемыми образцами поддерживали на уровне  $10,0 \pm 0,5$  °С. На рисунке 5 приведены кривые охлаждения обезжиренного молока, концентрированного обезжиренного молока и фракции льда после оттаивания.

Полученные кривые охлаждения имеют идентичный вид, на каждой кривой можно выделить 3 участка, соответствующих различным этапам вымораживания.

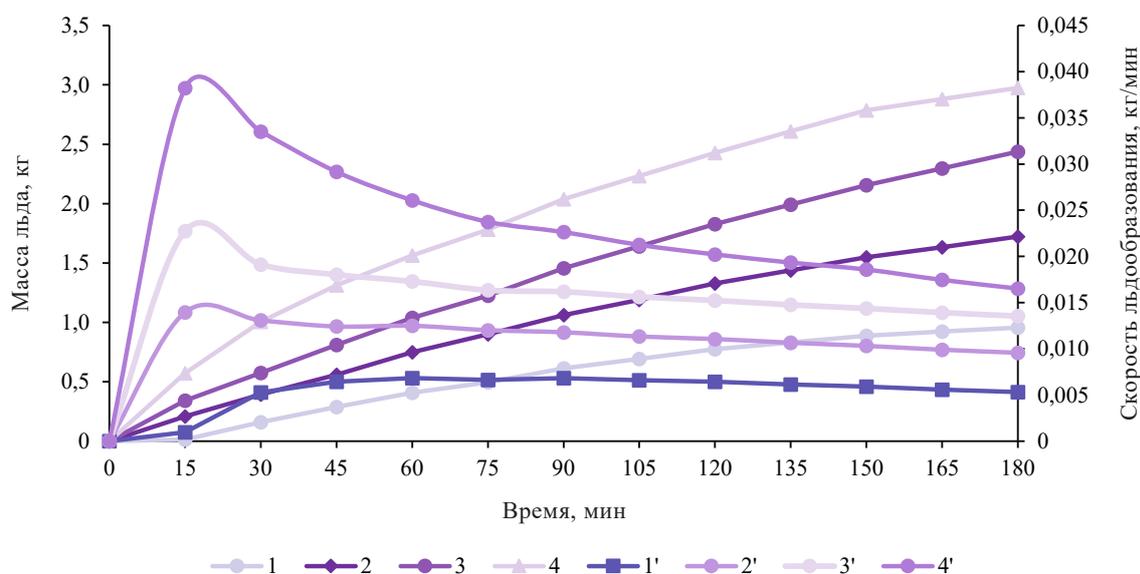


Рисунок 4. Изменение массы льда и скорость льдообразования. Линии (1–4) показывают изменение массы льда, а линии (1'–4') – скорость роста ледяной фракции в зависимости от продолжительности вымораживания и температуры хладоносителя (1, 1'  $-2$  °С; 2, 2'  $-4$  °С; 3, 3'  $-6$  °С; 4, 4'  $-8$  °С)

Figure 4. Ice mass dynamics (1–4) and ice growth rate (1'–4') depending on freezing time and coolant temperature (1, 1'  $-2$  °С; 2, 2'  $-4$  °С; 3, 3'  $-6$  °С; 4, 4'  $-8$  °С)

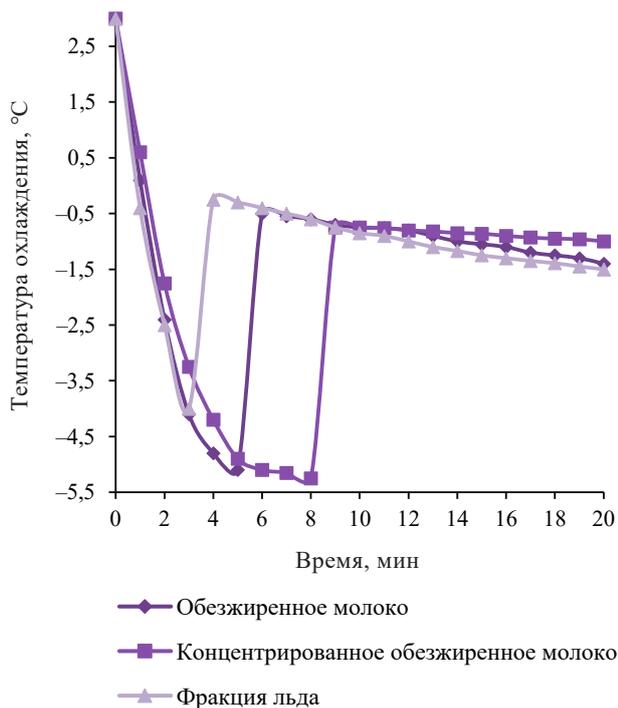


Рисунок 5. Кривые охлаждения

Figure 5. Cooling curves

Начальный участок кривой охлаждения имеет наклонный вид и соответствует охлаждению и переохлаждению исходных веществ от начальной температуры. При понижении температуры в растворах происходит образование центров кристаллизации (зародышей кристаллов) в жидкой фазе. Частота образования центров кристаллизации и их рост, зависящий от выделяющейся теплоты кристаллизации, определяют скорость кристаллизации раствора. Вышеперечисленные факторы влияют на форму образующихся кристаллов льда. Если скорость образования зародышей кристаллов выше скорости их роста, то образуется микрокристаллическая структура, в противном случае происходит образование макрокристаллических структур. В сложной дисперсной системе, которой является обезжиренное молоко, наблюдается периодическое образование фазы льда, при этом выделяется незначительная теплота кристаллизации или возникает переохлаждение. В конце переохлаждения наблюдается резкое увеличение температуры. Второй участок имеет практически линейный характер и соответствует кристаллизации свободной воды. Фазовое превращение воды в лед сопровождается выделением теплоты кристаллизации, и потому температура системы остается практически постоянной и соответствует температуре замерзания продукта. Незначительное понижение температуры на этом участке происходит за счет вымерзания влаги на теплообменной поверхности. На третьем участке происходит дальнейшее охлаждение замороженного продукта.

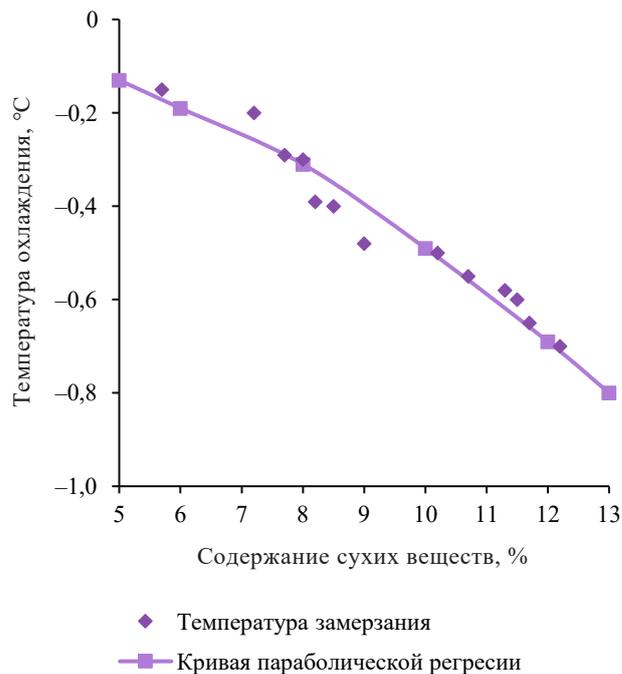


Рисунок 6. Температура замерзания обезжиренного молока

Figure 6. Freezing temperature of skim milk

Температура замерзания обезжиренного молока определяется содержанием сухих веществ. Во время разделительного вымораживания происходит кристаллизация свободной воды, следовательно, концентрация сухих веществ в растворе увеличивается. На рисунке 6 представлена зависимость температуры начала замерзания обезжиренного молока от содержания сухих веществ в жидкой фазе.

В процессе криоконцентрирования происходит образование преимущественно чистых кристаллов льда, а концентрация остаточного раствора при этом повышается, т. е. содержание сухих веществ увеличивается, что приводит к понижению температуры замерзания молока. При этом зависимость температуры замерзания обезжиренного молока от содержания сухих веществ носит нелинейный характер (рис. 6).

Математическая обработка экспериментальных данных позволила получить уравнение параболической регрессии, достаточно хорошо описывающее изменение температуры замерзания обезжиренного молока от содержания в нем сухих веществ:

$$t_{кр} = 0,005337 - 0,0052 \times \omega - 0,00438 \times \omega^2 \quad (1)$$

где  $t_{кр}$  – температура замерзания раствора, °С;  $\omega$  – содержание сухих веществ в молоке, %.

Температура начала замерзания обезжиренного молока, измеренная с помощью лабораторного стенда, схема которого представлена на рисунке 1, составила

$-0,50 \pm 0,05$  °С. Наибольший вклад (около 80 %) в температуру замерзания молока вносит лактоза и растворимые макроэлементы, оставшиеся 20 % приходятся на небелковые соединения, органические кислоты, карбамид. Снижение температуры замерзания молока ( $\Delta t_{кр}$ , °С) за счет присутствия в нем лактозы можно рассчитать, используя известное выражение для определения криоскопической температуры растворов неэлектролитов:

$$\Delta t_{кр} = 1,853 \times \frac{47 \times 1000}{342 \times 913} = 0,279 \quad (2)$$

где 1,853 °С кг/моль – криоскопическая постоянная для воды; 47 г – масса лактозы в 1 кг молока; 342 °С кг/моль – молярная масса лактозы; 913 г – содержание воды в 1 кг молока (табл. 1).

Понижение температуры замерзания обезжиренного молока за счет присутствия остальных растворимых веществ составит  $0,5 - 0,279 = 0,221$  °С.

Важным этапом исследований являлось определение оптимальной температуры для осуществления процесса низкотемпературного концентрирования обезжиренного молока. С этой целью в процессе вымораживания каждый час определяли содержание сухих веществ в концентратах. Изменение содержания сухих веществ в концентратах обезжиренного молока при заданных различных температурах хладоносителя представлено на рисунке 7.

Полученные результаты позволили сделать вывод о преимущественном влиянии температуры хладоносителя на содержание сухих веществ в концентрируемом обезжиренном молоке. При всех температурных режимах отмечается увеличение содержания сухих веществ с увеличением продолжительности криоконцентрирования и снижением температуры хладоносителя. При снижении температуры хладоносителя от  $-2$  °С

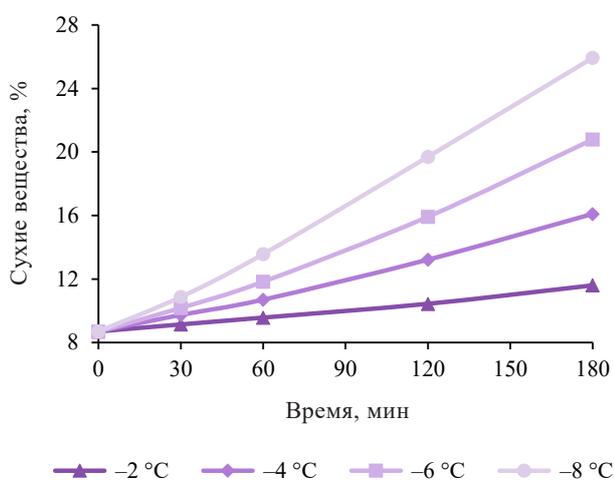


Рисунок 7. Содержание сухих веществ в концентрате обезжиренного молока

Figure 7. Solids in concentrated skim milk

до  $-8$  °С через 3 ч криоконцентрирования наблюдали увеличение содержания сухих веществ в 2,2 раза.

Математическая обработка экспериментальных данных позволила получить уравнение регрессии для расчета массовой доли сухих веществ в концентрированном обезжиренном молоке в зависимости от температуры и продолжительности вымораживания:

$$\omega = 9,078 + 0,07517 \times t - 1,538 \times \tau - 0,8099 \times \tau \times t - 8,503 \times 10^{-4} \times t^2 + 0,2679 \times \tau^2 \quad (3)$$

где  $\omega$  – содержание сухих веществ в концентрированном обезжиренном молоке, %;  $t$  – температура хладоносителя от  $-8$  до  $-2$  °С,  $\tau$  – время от начала кристаллизации, ч.

Используя зависимости, представленные на рисунке 7, рассчитали скорость изменения концентрации сухих веществ в полученном концентрированном обезжиренном молоке по формуле:

$$v_i = \frac{\omega_i - \omega_{i-1}}{\Delta t} \quad (4)$$

где  $v_i$  – скорость изменения массовой доли сухих веществ в  $i$ -й момент времени, %/час;  $\omega_i$  – массовая доля сухих веществ полученного концентрата в  $i$ -й момент времени, %,  $\Delta t$  – продолжительность криоконцентрирования, ч.

Результаты расчетов скорости роста содержания сухих веществ, выполненных по формуле, приведены на рисунке 8. При всех температурных режимах полученные зависимости имеют линейный вид и параллельны друг другу, тангенс угла наклона к оси ординат равен 0,5358. Это подтверждает преимущественное влияние температуры хладоносителя на изменение содержания сухих веществ в процессе концентрирования обезжиренного молока.

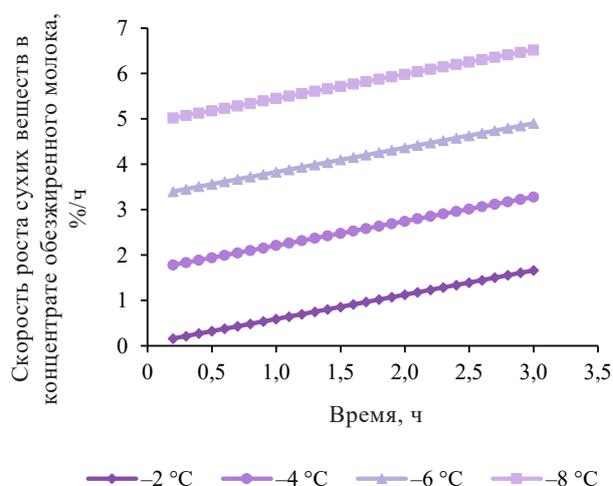


Рисунок 8. Скорость роста содержания сухих веществ

Figure 8. Solids increase rate

Таблица 2. Массовая доля сухих веществ в вымороженной фракции (n = 3), %

Table 2. Mass fraction of solids in ice (n = 3), %

Продолжительность криоконцентрирования, ч	Температура хладоносителя, °C			
	-2	-4	-6	-8
1	0,33 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,86 ± 0,02	1,28 ± 0,02
2	0,59 ± 0,02	1,18 ± 0,02	2,02 ± 0,02	3,00 ± 0,02
3	0,65 ± 0,02	1,64 ± 0,02	3,17 ± 0,02	5,05 ± 0,02

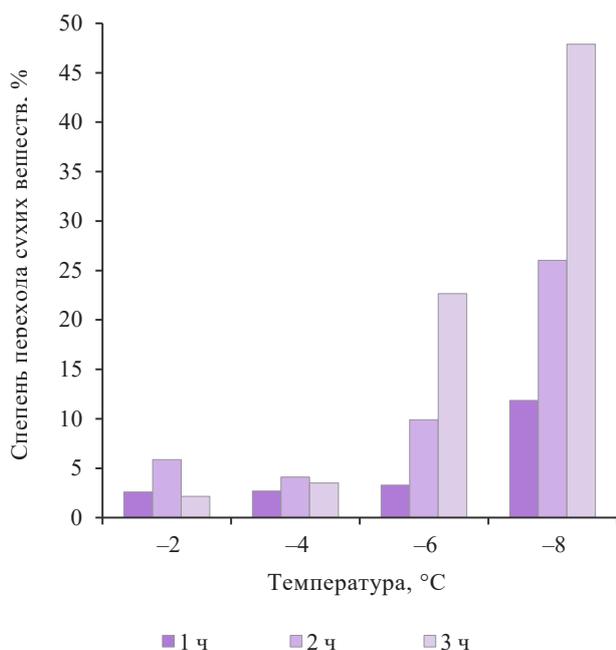


Рисунок 9. Степень перехода сухих веществ во фракцию льда

Figure 9. Transition of solids into ice

Снижение температуры хладоносителя приводит к увеличению скорости криоконцентрирования обезжиренного молока, а также влияет на скорость образования кристаллов льда, их размер и форму. В тех случаях, когда скорость образования и роста кристаллов льда достаточно велика, возможен захват составных частей молока в процессе кристаллообразования. Исследования по криоконцентрированию молочной сыворотки на охлаждаемой поверхности, проведенные в работе J. Sanchez и др., показали, что во фракцию льда в большей степени переходят жир и лактоза [19]. В связи с этим было исследовано влияние температуры хладоносителя на изменение содержания сухих веществ в вымороженной фракции льда. Результаты определений приведены в таблице 2.

Наименьшие потери сухих веществ при концентрировании обезжиренного молока вымораживанием отмечены для температуры -2 °C, наибольшие при -8 °C. Однако при температуре -2 °C содержание сухих веществ в концентрате обезжиренного молока через

3 ч составило не более 12,0 % (рис. 7). Снижение температуры криоконцентрирования до -8 °C позволяет получить продукт содержащий 26,0 % сухих веществ. Поэтому важной характеристикой процесса низкотемпературного концентрирования будет не только содержание сухих веществ в конечном продукте, но и степень перехода сухих веществ в фазу льда. Под степенью перехода понимается доля сухих веществ, перешедших в фазу льда при криоконцентрировании относительно их содержания в исходном молоке. Зависимость степени перехода сухих веществ обезжиренного молока в фазу льда от температуры хладоносителя и продолжительности криоконцентрирования представлена на рисунке 9.

Данные рисунка свидетельствуют о том, что степень перехода сухих веществ в фазу льда зависит от температуры хладоносителя и продолжительности вымораживания. В процессе криоконцентрирования степень перехода сухих веществ в фазу льда значительно увеличивается при температурах -6 и -8 °C. Минимальные потери сухих веществ при криоконцентрировании обезжиренного молока в течение 3 ч отмечены для температуры -2 °C, содержание сухих веществ в концентрированном молоке при этой температуре было также минимальным и составило менее 12,0 % (рис. 7). Оптимальная температура разделительного вымораживания составила -4 °C, при этой температуре степень перехода сухих веществ в фазу льда мало зависит от продолжительности криоконцентрирования и в среднем составляет 3,4 %. Как видно из рисунка 7, криоконцентрирование обезжиренного молока при этой температуре в течение 3 ч позволяет получить конечный продукт с содержанием сухого вещества - 16,0 %.

### Выводы

Проведенные исследования подтверждают, что интенсивность процесса криоконцентрирования при разделительном вымораживании обезжиренного молока определяется рабочими температурами процесса - температурой хладоносителя, воспринимающего теплоту от объекта низкотемпературной обработки, при его разделительном вымораживании, а также содержанием сухих веществ в обезжиренном молоке. Снижение температуры хладоносителя с -2 до -8 °C приводит к значительной интенсификации кристаллизации водной фракции. Содержание сухих веществ в концен-

трате возрастает в 2,2 раза. Существенно возрастает количество сухих веществ, переходящих в кристаллизат. Минимальные потери сухих веществ в процессе криоконцентрирования обезжиренного молока были обнаружены при температуре хладоносителя  $-4^{\circ}\text{C}$ . Степень перехода сухих веществ молока во фракцию льда в среднем составила 3,4 %. Согласно проведенным исследованиям, температура  $-4^{\circ}\text{C}$  будет оптимальной для концентрирования обезжиренного молока методом разделительного вымораживания в кристаллизаторах емкостного типа.

Важнейшими исходными данными при проектировании процессов криоконцентрирования являются криоскопические температуры объектов криоконцентрирования. В результате выполнения работы получили уравнения, позволяющие аналитически рассчитать температуру начала замерзания обезжиренного молока в зависимости от содержания сухих веществ и массовую долю сухих веществ в растворе

в зависимости от температуры и продолжительности разделительного вымораживания.

#### **Критерии авторства**

Авторы в равной степени участвовали в написании статьи.

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### **Contribution**

All authors have contributed equally to the study and are equally responsible for the information published in this article.

#### **Conflict of interest**

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

### **References/Список литературы**

1. Ternovykh KS, Kitaev YuA, Uzhik VF, Kitaeva OV. Structural changes in the production and consumption of milk and dairy products in Russia. *Vestnik of Voronezh State Agrarian University*. 2023;16(3):198–207. (In Russ.). [https://doi.org/10.53914/issn2071-2243\\_2023\\_3\\_198](https://doi.org/10.53914/issn2071-2243_2023_3_198); <https://elibrary.ru/MBFHVP>
2. Beketov SV, Kaledin AP, Senator SA, Upelnik VP, Kuznetsov SB, Stolpovsky YuA. Zeboid cow milk: physicochemical quality indicators. *Foods and Raw Materials*. 2022;10(1):171–175. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-20221-171-175>; <https://elibrary.ru/GNPHLD>
3. Yankovskaya VS, Dunchenko NI, Kuptsova SV, Manitskaya LN, Fedotovskaya MP. Factors affecting the safety and quality of raw milk for the production of sterilized drinking milk. *Dairy Industry*. (In Russ.). 2021;(9):57–59. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2021-09-57-59>; <https://elibrary.ru/ABSIYF>
4. Alkadour MI, Pryanichnikova NS, Yurova EA, Petrov AN. Effect of Thermal Treatment and Pasteurization on Milk Powder Quality. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2024;54(2):275–284. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2506>; <https://elibrary.ru/ZMQCHA>
5. Tsivilev AS, Minukhin LA. The concentration of milk in the multiple-effect evaporation plants. *Youth and Science*. 2021;(5):33. (In Russ.). [Цивилев А. С., Минухин Л. А. Концентрирование молока в многокорпусных выпарных установках // Молодежь и наука. 2021; № 3. Номер статьи 33.]. <https://elibrary.ru/PIFAOD>
6. Bagaev AA, Bobrovskiy SO. Electrotechnological Heat Treatment of Milk: Energy and Exergy Efficiency. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(2):272–280. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-2-2428>; <https://elibrary.ru/SBXYHE>
7. Neverov EN, Korotkiy IA, Bakin IA, Borodulin DM, Korotkaya EV, Gorelkina AK, *et al.* Power supply, technological machinery, and agro-industrial equipment. *Kemerovo: Kemerovo State University*; 2022. 168 p. (In Russ.). [Энергоснабжение, технологические машины и оборудование агропромышленного комплекса / Е. Н. Неверов [и др.]. Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2022. 168 с.]. <https://elibrary.ru/AGVWZD>
8. Ostroumov LA, Korotkaya EV, Maltseva OM. Effects of cryoconcentrating on the level of the skim milk total solids. *Dairy Industry*. 2018;(8):60–61. (In Russ.). <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2018-8-60-61>; <https://elibrary.ru/UVDFWI>
9. Vodyakov VN, Kuvshinova OA, Repin AD. Study of the milk concentration process using ultrafiltration. *Machinery and Equipment for Rural Area*. 2020;(5):27–31. (In Russ.). <https://doi.org/10.33267/2072-9642-2020-5-27-31>; <https://elibrary.ru/MDACKE>
10. Balde A, Aider M. Effect of cryoconcentration, reverse osmosis and vacuum evaporation as concentration step of skim milk prior to drying on the powder properties. *Powder Technology*. 2017;319:463–471. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.016>
11. Balde A, Aider M. Impact of sterilization and storage on the properties of concentrated skim milk by cryoconcentration in comparison with vacuum evaporation and reverse osmosis concentration. *Food Process Engineering*. 2019;42(5):e13130. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13130>

12. Zielinski AAF, Zardo DM, Alberti A, Bortolini DG, Benvenuti L, Demiate IM. Effect of cryoconcentration process on phenolic compounds and antioxidant activity in apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019; 99(6):2786–2792. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9486>
13. Korotkiy I, Korotkay E, Neverov E. Prospects for using the method of separation freezing for whey processing. *Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019;395:012070. <http://doi.org/10.1088/1755-1315/395/1/012070>; <https://elibrary.ru/HVBQQR>
14. Korotkiy I, Neverov E, Gorelkina A, Korotkaya E, Zadesenets A. The dehydrator parameters for convective drying of food products. *BIO Web of Conferences*. 2023;64:01023. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20236401023>
15. Petzold G, Orellana P, Moreno J, Cuevas C. Process Parameters of Vacuum-assisted Freeze Concentration. *Chemical Engineering Transactions*. 2017;57:1789–1794. <https://doi.org/10.3303/CET1757299>
16. Zhang B, Feng X. Assessment of pervaporative concentration of dairy solutions vs ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis. *Separation and Purification Technology*. 2022;292:120990. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.120990>
17. Arriaga-Lorenzo P, de Jesús Maldonado-Simán E, Ramírez-Valverde R, Martínez-Hernández PA, Tirado-González DN, Saavedra-Jiménez LA. Cold chain relevance in the food safety of perishable products. *Foods and Raw Materials*. 2023;11(1):116–128. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-559>; <https://elibrary.ru/JKSWOT>
18. Alinovi M, Mucchetti G, Wiking L, Corredig M. Freezing as a solution to preserve the quality of dairy products: the case of milk, curds and cheese. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020;61(20):3340–3360. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1798348>
19. Sánchez J, Hernández E, Auleda JM, Raventós M. Review: Freeze Concentration Technology Applied to Dairy Products. *Food Science and Technology International*. 2011;17(1):5–13. <https://doi.org/10.1177/1082013210382479>
20. Amran NA, Samsuri S, Jusoh M. Effect of Freezing Time and Shaking Speed on the Performance of Progressive Freeze Concentration via Vertical Finned Crystallizer. 2018;15(2):5356–5366. <https://doi.org/10.15282/ijame.15.2.2018.15.0412>
21. Hauptmann A, Podgoršek K, Kuzman D, Srčič S, Hoelzl G, Loerting T. Impact of Buffer, Protein Concentration and Sucrose Addition on the Aggregation and Particle Formation during Freezing and Thawing. *Pharmaceutical Research*. 2018;35:101. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2378-5>
22. Orellana-Palma P, González Y, Petzold G. Improvement of Centrifugal Cryoconcentration by Ice Recovery Applied to Orange Juice. *Chemical Engineering and Technology*. 2019;42(4):925–931. <https://doi.org/10.1002/ceat.201800639>
23. Orellana-Palma P, Petzold G, Guerra-Valle M, Astudillo-Lagos M. Impact of block cryoconcentration on polyphenol retention in blueberry juice. *Food Bioscience*. 2017;20:149–158. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.006>
24. Orellana-Palma P, Takhar PS, Petzold G. Increasing the separation of block cryoconcentration through a novel centrifugal filter-based method Separation. *Science and Technology*. 2019;54(5):786–794. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1512615>
25. Murillo D, Hernandez E, Raventos M, Prudencio ES, Canella MHM. Progressive freeze concentration of saccharose solutions through magnetic agitation. *Afinidad*. 2020;590:85–91.
26. Orellana-Palma P, Tobar-Bolaños G, Casas-Forero N, Zúñiga RN, Petzold G. Quality Attributes of Cryoconcentrated Calafate (*Berberis microphylla*) Juice during Refrigerated Storage. *Foods*. 2020;9(9):1314. <https://doi.org/10.3390/foods9091314>
27. Orellana-Palma P, Lazo-Mercado V, Gianelli MP, Hernández E, Zúñiga RN, Petzold G. Influence of Cryoconcentration on Quality Attributes of Apple Juice (*Malus Domestica* cv. *Red Fuji*). *Applied Sciences*. 2020;10(3):959. <https://doi.org/10.3390/app10030959>
28. Petzold G, Orellana P, Moreno J, Valeria P. Physicochemical Properties of Cryoconcentrated Orange Juice. *Chemical Engineering Transactions*. 2019;75:37–42. <https://doi.org/10.3303/CET1975007>
29. Korotkiy IA, Neverov EN, Rasshchepkin AN, Fedorov DE, Korotkaya EV. The low-temperature technology of processing the blood of slaughtered animals. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2020;15(21):2414–2423. <https://elibrary.ru/YVOJWB>
30. Ovsyannikov VYu, Klyuchnikov AI, Lobacheva NN, Berestovoy AA. Concentration of cattle blood by moisture freezing. *Conference Series: Earth And Environmental Science*; 2019; Krasnoyarsk. Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations; 2019:42021. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/315/4/042021>; <https://elibrary.ru/GFRJLL>
31. Bastías-Montes JM, Martín V-S, Muñoz-Fariña O, Petzold-Maldonado G, Quevedo-León R, Wang H, et al. Cryoconcentration procedure for aqueous extracts of maqui fruits prepared by centrifugation and filtration from fruits harvested in different years from the same localities. *Journal of Berry Research*. 2019;9(3):377–394. <https://doi.org/10.3233/JBR-180368>
32. Zambrano A, Ruiz Y, Hernández E, Raventós M, Moreno FL. Freeze desalination by the integration of falling film and block freeze-concentration techniques. *Desalination*. 2018;436:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2018.02.015>
33. Kolhe P, Goswam S. Bulk Protein Solution: Freeze–Thaw Process, Storage and Shipping Considerations. In: Warne NW, Mahler H-C, editors. *Challenges in Protein Product Development*. Cham: Springer; 2018. pp. 313–336. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90603-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90603-4_15)

34. Bredun MA, Prestes AA, Panceri CP, Prudêncio ES, Burin VM. Bioactive compounds recovery by freeze concentration process from winemaking by-product. *Food Research International*. 2023;173:113220. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113220>

35. Korotkiy IA, Korotkaya EV, Neverov EN, Fedorov DE, Gushchin AA. The parameters selection for separating freezing-out for extracting the components from curd whey. *Conference Series: Earth and Environmental Science*; 2021; International Conference on Production and Processing of Agricultural Raw Materials Technology of Fats and Oils; 2021;640:042016. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/640/4/042016>; <https://elibrary.ru/BANNPK>

36. Lamkaddam IU, Vega E, Colón J, Ponsá S, LlenasL, Mora M. Progressive freeze concentration of cheese whey for protein and lactose recovery. *International Dairy Journal*. 2023;139:105572. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105572>

37. Korotkiy IA, Gunko PA, Maltseva OM, Uchajkin AV. Device for liquid food products concentration. Russia patent RU 2509514C1. 2014. [Устройство для концентрирования жидких пищевых продуктов: пат. 2509514C1 Рос. Федерация. № 2012146711/13 / Короткий И. А., Гунько П. А., Мальцева О. М., Учайкин А. В.; заявл. 01.11.2012; опублик. 20.03.2014. 5 с. Бюл. № 8.]

38. Korotkiy IA, Korotkaya EV, Neverov EN, Plotnikov IB, Efremov DA. Separatory freezing and cryoconcentration of milk and whey. 2021; Veliky Novgorod. *Veliky Novgorod: Innovative Technologies in Agroindustrial, Forestry and Chemical Complexes and Environmental Management*; 2021. 012052. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/852/1/012052>; <https://elibrary.ru/GTZKJF>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2546>  
<https://elibrary.ru/CTFENE>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Мониторинг подлинности и качества концентрированного виноградного сусла



Н. В. Гниломедова\*<sup>ID</sup>, А. В. Весютова<sup>ID</sup>, Н. С. Аникина<sup>ID</sup>,  
М. В. Ермихина<sup>ID</sup>, В. А. Олейникова<sup>ID</sup>

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства  
и виноделия «Магарач» РАН<sup>ROR</sup>, Ялта, Россия

Поступила в редакцию: 12.03.2024

Принята после рецензирования: 18.04.2024

Принята к публикации: 07.05.2024

\*Н. В. Гниломедова: 231462@mail.ru,

<https://orcid.org/0000-0003-1784-2370>

А. В. Весютова: <https://orcid.org/0000-0003-3815-5756>

Н. С. Аникина: <https://orcid.org/0000-0001-5682-3426>

М. В. Ермихина: <https://orcid.org/0000-0001-6457-2129>

В. А. Олейникова: <https://orcid.org/0000-0002-0252-8904>

© Н. В. Гниломедова, А. В. Весютова, Н. С. Аникина,  
М. В. Ермихина, В. А. Олейникова, 2024



### Аннотация.

В российском виноделии разрешено применение концентрированного виноградного сусла, подделка которого является острой проблемой, что в значительной мере обусловлено его дефицитом на рынке. Цель работы заключалась в разработке комплексной системы оценки качества концентрированного виноградного сусла для исключения фальсификации и дестабилизации полусухих и полусладких вин.

Объектами исследования являлись свежее и концентрированное виноградное сусло, коммерческие препараты концентрированного виноградного сусла из винограда белых сортов, сахарный и глюкозно-фруктозный сиропы. Всего исследовано 446 образцов. Профиль органических кислот и сахаров определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Виноматериалы после внесения аутентичного концентрированного виноградного сусла испытывали на склонность к коллоидным помутнениям и кристаллической дестабилизации.

Установили, что аутентичные образцы сохраняют «отпечаток» химического состава виноградной ягоды, о чем свидетельствуют маркеры подлинности: рН, содержание дисахаридов, винной и яблочной кислот, глюкозо-фруктозный индекс. В подделках значения маркеров выходят за установленные пределы. Из 179 проанализированных образцов коммерческих препаратов выявили 21 % случаев смешивания аутентичного сусла с различными продуктами, 9 % – подмены сиропами и 1 % – концентрированным яблочным соком. Показали, что после внесения подлинного концентрированного сусла в виноматериалы проявилась склонность к коллоидным помутнениям – 17 %, кристаллической дестабилизации – 13 %, комплексной дестабилизации – 13 %. Это обусловлено недостаточно качественной подготовкой свежего виноградного сусла перед вакуумированием, что приводит к увеличению содержания высокомолекулярных компонентов, а также тартрат-анионов и катионов калия в концентрированном продукте.

Предложили поэтапную оценку качества концентрированного виноградного сусла для обеспечения аутентичности и розливостойкости вин: I – подтверждение виноградного происхождения образца; II – оценка влияния подлинного продукта на коллоидную и кристаллическую стабильность вина и принятие адекватных технологических решений.

**Ключевые слова.** Виноград, географическое происхождение, фальсификация, подлинность вина, глюкозно-фруктозный сироп, коллоидные помутнения, кристаллическая дестабилизация

**Для цитирования:** Мониторинг подлинности и качества концентрированного виноградного сусла / Н. В. Гниломедова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 794–806. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2546>

## Monitoring Authenticity and Quality of Concentrated Grape Must

Nonna V. Gnilomedova\*<sup>ORCID</sup>, Antonina V. Vesytova<sup>ORCID</sup>,  
Nadezhda S. Anikina<sup>ORCID</sup>, Marianna V. Ermikhina<sup>ORCID</sup>,  
Veronica A. Oleinikova<sup>ORCID</sup>



All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking “Magarach” of RAS<sup>ORCID</sup>, Yalta, Russia

Received: 12.03.2024  
Revised: 18.04.2024  
Accepted: 07.05.2024

\*Nonna V. Gnilomedova: 231462@mail.ru,  
<https://orcid.org/0000-0003-1784-2370>  
Antonina V. Vesytova: <https://orcid.org/0000-0003-3815-5756>  
Nadezhda S. Anikina: <https://orcid.org/0000-0001-5682-3426>  
Marianna V. Ermikhina: <https://orcid.org/0000-0001-6457-2129>  
Veronica A. Oleinikova: <https://orcid.org/0000-0002-0252-8904>

© N.V. Gnilomedova, A.V. Vesytova, N.S. Anikina, M.V. Ermikhina,  
V.A. Oleinikova, 2024



### Abstract.

The Russian wine industry permits the use of concentrated grape must. Due to its shortage on the market, it often becomes subject to adulteration. The article introduces a comprehensive system for assessing the quality of concentrated grape must that prevents adulteration of semi-dry and semi-sweet wines.

The research featured 446 samples of fresh and concentrated grape must, commercial preparations of concentrated white grape must, and sugar or glucose-fructose syrups. The method of high-performance liquid chromatography made it possible to identify the profile of organic acids and sugars. After introducing authentic concentrated grape must, the samples were tested for colloidal turbidity and crystalline destabilization.

The authentic samples retained the chemical composition of the original grape variety, as evidenced by such authenticity markers as pH, disaccharide content, tartaric and malic acids, and glucose-fructose index. In the adulterate samples, these values did not fit the standard limits. The experiment involved 179 samples of commercial preparations: 21% proved to be mixes of authentic must with other products; 9% proved to be syrup substitutes, and 1% was concentrated apple juice. Authentic concentrated must aggravated the trend to colloidal opacity (17%) and crystalline destabilization (13%); a combination of both trends occurred in 13%. Low-quality preparation of fresh grape must before vacuuming increased the content of high-molecular components, tartrate anions, and potassium cations in the concentrated product.

The following two-step assessment of concentrated grape must quality made it possible to adopt a rational technological solution: I – confirming the grape origin; II – assessing the effect of the authentic product on the colloidal and crystalline stability of wine. This protocol demonstrated a good potential for ensuring the authenticity and bottling stability of semi-dry and semi-sweet wines.

**Keywords.** Grape, geographical origin, adulteration, authenticity, glucose-fructose syrup, colloidal haze, crystalline destabilization

**For citation:** Gnilomedova NV, Vesytova AV, Anikina NS, Ermikhina MV, Oleinikova VA. Monitoring Authenticity and Quality of Concentrated Grape Must. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):794–806. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2546>

### Введение

В России за последние годы повысился интерес потребителей к сухим винам, при этом доля реализуемых полусухих и полусладких вин по-прежнему высока. При производстве такой продукции законодательно разрешено применять концентрированное виноградное сусло, причем с 27.06.2023 для вин России допускается продукт, выработанный исключительно из отечественного винограда (Федеральный закон № 468 «О виноградарстве и виноделии в Российской Федерации» от 27.12.2019 (№ 345–ФЗ

в ред. от 02.07.2021)). До вступления в силу ФЗ № 468 в разные периоды времени данный вид продукта именовался «сусло виноградное концентрированное», «вакуум-сусло» или «концентрированный виноградный сок» в соответствии с нормативно-технической документацией, действующей на момент проведения исследований.

На сегодняшний день серьезная проблема виноделов заключается в отсутствии достаточных технических возможностей производства (оборудование для вымораживания, вакуумирования либо обработки обратным

осмосом свежего суслу) и достаточного количества сырья для обеспечения необходимого выпуска полу-сухих и полусладких вин, что может привести к сокращению объемов реализации данного вида винодельческой продукции. Переориентация отрасли на продукт российского производства требует большего периода, чем заложено в ФЗ № 468 – 7 лет со дня вступления в силу (27.12.2019), т. к. необходимы этапы увеличения площадей плодоносящих виноградников, переход на импортозамещение с разработкой отечественного оборудования и комплектующих, а также налаживание процесса концентрирования в соответствии с технологическим потенциалом каждого изготовителя.

Вынужденность винопроизводителей заготавливать в сезон уборки урожая концентрированное сусло для дальнейшего его использования в течение года без должной предварительной отработки режимов и параметров концентрирования может приводить к технологическим проблемам. Неподготовленное свежее сусло при концентрировании привносит в вино-материал значительное количество высокомолекулярных веществ, винной кислоты и катионов калия и кальция, а также клетки микроорганизмов. Добавка такого продукта в вино-материалы, в случае отсутствия либо недостаточно эффективной дальнейшей их обработки перед розливом, повышает риск дестабилизации готовой продукции (развитие коллоидного и/или микробиального помутнений, формирование кристаллического осадка) [1].

В современном мире вопрос безопасности и контроля качества пищевых продуктов стоит весьма остро, что отмечается в исследованиях, посвященных способам выявления их фальсификации. К решению данной проблемы активно подключаются специалисты в области пищевой и аналитической химии, в задачи которых входит поиск маркеров, подтверждающих аутентичность различных продуктов. В частности, проблемой является фальсификация концентрированного виноградного суслу, что в значительной мере обусловлено его дефицитом на рынке. Актуальность выявления фальсификации соков касается не только виноградной продукции, подмена различными дешевыми сиропами и подсластителями, например яблочного концентрата, гранатового, апельсинового и мангового соков, весьма актуальна для соковой промышленности, острота данной проблемы отмечена в многочисленных исследованиях [2–6].

Учитывая характерные особенности профиля органических кислот и сахаров в плодах различных ботанических видов, указанные вещества возможно применять как критерии для дифференциации продукции [7–10]. В качестве дискриминирующих факторов предлагаются такие показатели, как содержание винной кислоты, соотношение содержания яблочной и лимонной кислот; содержание глюкозы, фруктозы, сорбита, сахарозы, мальтозы и соотношение содержания глюкозы и фруктозы.

Показано, что наиболее частым видом подделки является частичная или полная подмена виноградной основы на сахарный или глюкозно-фруктозный сиропы, зачастую с добавлением колера и ароматизатора. Такие виды сиропов широко распространены и все больше востребованы в пищевой промышленности [5, 6, 9–11], в том числе глюкозно-фруктозный сироп, который используется для приготовления алкогольных напитков виноградного происхождения [12].

Глюкозно-фруктозные сиропы производятся на основе зернового сырья путем выделения крахмальной фракции, которая затем подвергается ферментному или кислотному осахариванию. Путем управления этим процессом можно получать углеводный состав готового продукта с желаемым содержанием моносахаридов, наиболее распространенный вариант – содержание глюкозы порядка 58–66 % и фруктозы – 42–44 % [10]. Безопасность для здоровья и низкая себестоимость сиропов (на 10–40 % ниже, чем белого сахара) делает их все более востребованными в пищевой промышленности. Существует такой продукт, как высокофруктозный сироп, в котором содержание фруктозы достигает 90–95 %, однако он имеет значительно более высокую стоимость, что ограничивает широкое применение [10].

Для оценки качества фруктов и соковой продукции широко применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющий получить подробную характеристику состава и точного количественного содержания органических кислот и сахаров в объекте исследования [2, 13–18]. Высокоэффективная жидкостная хроматография является официальным методом определения глюкозы, фруктозы и сахарозы в соковой продукции согласно международным требованиям (Food and Agriculture Organization of the United Nations. Codex general standard for fruit juices and nectars (CODEX STAN 247-2005)).

Информация, представленная в литературе, свидетельствует, что доля различных органических кислот в их общем содержании существенно различается в зависимости от ботанической принадлежности фруктов. Винная кислота в значительном количестве обнаружена только в виноградном соке, ее доля составляет 58–90 %; яблочная кислота является доминирующей в яблочном (70–88 %) и черешневом (97–98 %) соках; лимонная кислота преобладает в соках клубники и черники (62–84 и 73–90 % соответственно).

Профиль сахаров имеет видоспецифические особенности, в виноградном соке в сумме сахаров преобладают глюкоза и фруктоза [7, 16, 19]. По данным Н. X. Zhong и др., содержание глюкозы в винограде 18 сортов колебалось в пределах 42–47 %, а фруктозы – 43–51 % [20]. Сахароза в винограде не диагностируется либо содержится в следовом количестве, однако в других плодах она может быть доминирующим сахаром, например, в персиковом соке на ее долю приходится 59–77 % от общего содержания сахаров [7, 8, 15, 21].

Существуют маркеры, которые не относятся к углеводам. Для обнаружения добавления яблочного сока в виноградный некоторые авторы предлагают устанавливать по содержанию флоризина и сорбита веществ, не синтезируемых в виноградной ягоде [14].

Содержание глюкозы и фруктозы и их расчетное соотношение предложено для характеристики винограда более полувека назад [22, 23]. Было показано, что значение соотношения глюкоза:фруктоза находится в диапазоне от 0,74 до 1,05 (в среднем 0,94 для раннего и 0,85 для позднего сбора урожая); по другим исследованиям – 0,80–1,12, однако на тот период времени показатель не нашел широкого применения в виноградарстве и виноделии [22, 23]. С развитием технических возможностей в области аналитики пищевых продуктов к данному показателю возобновляется интерес для характеристики различных плодов и ягод, в том числе как к критерию подлинности при идентификации соков по ботаническому происхождению [8, 15].

Помимо веществ углеводного комплекса, маркерами виноградного происхождения продуктов являются органические кислоты. Так, значимое количество винной кислоты из всех плодов накапливается только в ягодах винограда, и она остается доминирующим компонентом кислотного комплекса в винах [24–27]. Содержание данной кислоты в значительной степени зависит от сортовых особенностей винограда, климатических условий региона выращивания и стадии зрелости [25]. Отсутствие либо очень низкое количество винной кислоты свидетельствует о подделке продукта. Исключение составляет концентрированное ректифицированное виноградное сусло. Этот продукт получают путем удаления из сусла катионов, анионов и фенольных соединений с помощью ионообменных смол и последующего концентрирования методом вакуумирования. Содержание растворимых сухих веществ находится на уровне 68–70 °Brix, включает смесь глюкозы, фруктозы и микроэлементов [21].

Учитывая, что сиропы и некоторые фруктовые соки дешевле виноградного концентрированного сусла, недобросовестные производители активно используют наименование данной торговой позиции. Винопроизводителям следует помнить, что, согласно ФЗ № 468, использование продукта невинного происхождения для достижения кондиций по содержанию сахаров в процессе изготовления вин автоматически переводит их в разряд фальсификатов.

Таким образом, оценка аутентичности и качества закупаемого концентрированного сусла и сусла собственного производства является достаточно актуальным вопросом в области управления процессами в виноделии.

Цель данной работы заключается в разработке комплексной системы оценки качества концентрированного виноградного сусла для исключения фальсификации и дестабилизации полусухих и полусладких вин.

## Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись свежее и концентрированное виноградное сусло и сахарный сироп, полученные в лабораторных условиях; коммерческие препараты концентрированного виноградного сусла из винограда белых сортов (страна производства: Аргентина, Германия, Греция, Италия, Испания, Иран, Молдова, Россия, Турция, Узбекистан, Украина, Уругвай, Чили), предоставленные винопроизводителями для научных исследований. Всего было проанализировано 446 образцов различных продуктов виноградного и невинного происхождения. Исследования проводились в 2013–2023 гг. на базе лаборатории химии и биохимии вина Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия «Магарач» РАН.

Для исследования показателей, характерных для аутентичного сусла, отбирали среднюю пробу ягод винограда белых технических сортов, произрастающих в Крыму. Ягоды отделяли от гребней и измельчали в гомогенизаторе, для отделения сусла полученную мезгу отпрессовывали через тканевой фильтр. Определение физико-химических показателей в сусле проводили после его предварительного центрифугирования (скорость вращения ротора центрифуги – 6 тыс. оборотов в минуту, время – 10 мин). В аналитическую базу данных включались варианты с содержанием сахаров не менее 18 г/100 см<sup>3</sup>.

Опытные партии концентрированного сусла выработывали в лабораторных условиях. Для получения указанного продукта виноград перерабатывали с отделением гребней и отпрессовывали, полученное сусло отстаивали 12 ч при температуре 4 °С, затем снимали с осадка. На концентрирование направлялись образцы без признаков брожения; процесс проводили на ротационном испарителе Laborota 4003 control (производство фирмы Heidolf, Германия); температура вакуума на всем протяжении технологического цикла не превышала 40 °С. Обезвоживание сусла прекращали при достижении содержания сахаров в продукте 65 ± 1 г/кг.

Сахарный сироп концентрации 65 % готовили путем растворения сахара белого в дистиллированной воде при нагревании до 100 °С.

Оценку подлинности концентрированного сусла опытных и производственных партий проводили в соответствии с ранее разработанной авторами методикой по следующими критериями подлинности: рН, расчетные показатели – глюкозно-фруктозный индекс (отношение содержания глюкозы к фруктозе) и доля дисахаридов в пересчете на сахарозу в сумме содержания сахаров (дисахаридов, глюкозы, фруктозы); доля винной и лимонной кислот в сумме кислот (лимонной, винной, яблочной) [1]. Профиль органических кислот и сахаров определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Shimadzu LC Prominence (Япония).

Определение проводили согласно предварительной градуировке прибора по стандартным растворам чистых веществ на рефрактометрическом (глюкоза, фруктоза, дисахариды, глицерин) и спектрофотометрическом (лимонная, винная, яблочная кислоты) детекторах системы с учетом времени выхода каждого вещества. Рабочая длина волны при определении органических кислот составила 210 нм. Разделение пробы проводили на колонке Supelcogel C610H, заполненной сорбентом на основе сульфитированного дивинилполистирола (размер колонки 300×7,8, зернение сорбента не более 10,0 мкм, Supelco, Sigma-Aldrich), в изократическом режиме подачи элюента (водный раствор ортофосфорной кислоты – 1 г/дм<sup>3</sup>, скорость – 0,5 см<sup>3</sup>/мин).

Во избежание искажения объективной информации о содержании различных форм сахаров для исследования тщательно отбирали образцы без признаков брожения. В экспериментальную базу данных включали образцы свежего сусла с содержанием этилового спирта не более 0,01 %об.; концентрированного сусла, сиропов с отсутствием на поверхности первых визуальных признаков забраживания в виде отдельных пузырьков углекислого газа – продукта метаболизма дрожжевых клеток, а также без отклонений в ароматике (появление тонов брожения или микробальной порчи). Такие строгие требования к объекту исследования обусловлены тем, что процесс брожения могут проводить как глюкозофильные, так и фруктозофильные дрожжи, приоритетно потребляющие глюкозу либо фруктозу соответственно [28–30]. Изменение соотношения глюкоза: фруктоза происходит еще до проявления активного процесса, что не позволяет сделать объективный вывод об исходном значении показателя.

Пробоподготовка концентрированного сусла для аналитических исследований включала предварительное его разбавление по весу в 10 раз. В случае обнаружения в разбавленном образце опала или взвесей проба подвергалась центрифугированию (частота вращения ротора – 6000 об/мин, длительность – 5 мин). Для исследования отбирали надосадочный слой жидкости.

**Определение pH** осуществляли непосредственно в пробе исследуемого продукта (свежее и концентрированное сусло, сиропы, яблочный концентрат) без его разбавления.

**Оценку влияния концентрированного сусла на стабильность вин** проводили путем его внесения в обработанный, сухой белый, стабильный ко всем видам помутнений виноматериал. Для эксперимента отбирали образцы, которые полностью соответствовали требованиям, предъявляемым к подлинным продуктам, выработанным из винограда. Массовая концентрация сахаров в виноматериалах доводилась до  $30 \pm 1$  г/дм<sup>3</sup>, после чего полученный полусладкий виноматериал отфильтровывали через фильтр-

картон и тестировали на склонность к кристаллическим и коллоидным помутнениям.

**Определение склонности вин к необратимым коллоидным помутнениям** основано на создании условий для взаимодействия присутствующих белковых веществ виноградной природы с внесенными фенольными компонентами в виде галлотанина и образовании нерастворимых комплексов, приводящих к укрупнению коллоидных частиц, снижающих прозрачность раствора.

**Техника определения.** В пробирку на 50 см<sup>3</sup> помещали 20 см<sup>3</sup> пробы, добавляли 1 см<sup>3</sup> водно-спиртового раствора галлотанина массовой концентрации 250 г/дм<sup>3</sup> (доля этанола – 40 %об.) и выдерживали 15 мин. Затем пробу нагревали на водяной бане до 100 °С, после закипания в пробирке выдерживали при этой температуре на протяжении 3 мин. По окончании указанного времени пробу охлаждали до комнатной температуры (20 °С) и оценивали ее мутность нефелометрически.

**Результаты испытания.** Если величина мутности не превышала 1 ф.е. (образец отвечает категории «прозрачный»), проба считалась устойчивой к необратимым коллоидным помутнениям, обусловленным наличием белков. В случае превышения мутности 1 ф.е. либо проявления выраженного опала, делался вывод о необходимости обработки образца виноматериала для удаления высокомолекулярных соединений и предотвращения развития помутнения в готовой продукции.

**Определение склонности к кристаллической калиевой дестабилизации** основано на провокации взаимодействия винной кислоты (тарترات-анионов) и катионов калия путем охлаждения пробы; для ускорения процесса роста кристаллов и более четкой визуализации результатов вносят затравку в виде единичных мелких кристаллов препарата битартрата калия.

**Техника определения.** В пробирку с 10 см<sup>3</sup> исследуемого образца на кончике иглы вводили несколько кристаллов препарата битартрата калия, предварительно измельченного в ступке, помещали в термостат при температуре  $-3,5 \pm 0,5$  °С и выдерживали на протяжении 2 суток.

**Результаты испытания.** Отсутствие осадка свидетельствовало об устойчивости образца к кристаллической дестабилизации. В случае появления хорошо визуально заметных кристаллов делался вывод о необходимости обработки образца виноматериала холодом для удаления избытка винной кислоты и калия в целях предотвращения формирования осадка в готовой продукции.

### Результаты и их обсуждение

Работа состояла из двух этапов: первый – оценка подлинности промышленных образцов, заявленных как концентрированное виноградное сусло; второй – оценка влияния подлинных образцов на стабильность виноматериалов.

**Оценка подлинности концентрированного виноградного сусла.** На протяжении 10 лет авторами данной работы проводились исследования, направленные на изучение энохимических показателей и их диапазонов, подтверждающих аутентичность продукции, выработанной из винограда [31, 32]. Были проанализированы продукты заведомо известного виноградного и невинного происхождения, а также заявленные как концентрированное виноградное сусло (сусло виноградное концентрированное), закупаемое винопроизводителями для производства полусухих и полусладких вин. Обобщение результатов многолетней теоретической и практической работы позволило выделить наиболее характерные органолептические свойства и диапазоны варибельности критериальных показателей подлинности аутентичных продуктов (табл. 1 и 2).

Как следует из представленных данных, органолептические характеристики исследованных продуктов достаточно различаются. Для свежего сусла, полученного из зрелого винограда, характерны соломенный и золотистый цвет различной интенсивности; аромат – виноградного сока без признаков забраживания; кисло-сладкий вкус. Выраженность всех показателей, а также прозрачность сусла и наличие мутящих частиц значительно варьируются в зависимости от сортовых особенностей, степени зрелости винограда и технологии получения и обработки сусла. После его концентрирования цвет становится более интенсивным – от светло-золотистого до темно-янтарного; аромат – различной степени яркости цветочные, фруктовые тона и тона уваренных сухофруктов, в отдельных случаях с выраженными сортовыми признаками; вкус – кисло-сладким, с легкими тонами уваренности в послевкусии. При внешнем осмотре могут быть обна-

ружены включения в толще продукта и осадок, представленный кристаллами сахаров и виннокислых солей.

Концентрированный яблочный сок по цвету приближается к виноградному, однако в аромате отмечаются плодовые тона, не свойственные винограду.

При идентификации перечисленных продуктов нельзя ограничиваться только органолептическими показателями, что связано, с одной стороны, с человеческим фактором – профессионализмом дегустатора и его опытом работы с различными пищевыми продуктами, с другой стороны, обусловлено объективными технологическими причинами – в случае слабой / умеренной выраженности характерных признаков фальсификация путем купажирования различных продуктов может быть не установлена. Это ограничивает надежность органолептического заключения, т. к. однозначное решение может быть принято только при четко заметных посторонних либо полном отсутствии обязательных дескрипторов цвета, аромата и вкуса.

Более объективным критерием является физико-химическая характеристика, опирающаяся на специфические показатели, обоснованные ранее (табл. 2). Наиболее важным показателем является профиль кислот и сахаров как видоспецифическая характеристика продуктов, выработанных из различного растительного сырья. Из представленных данных следует, что физико-химические показатели существенно отличаются в исследованных образцах.

Результаты исследования свидетельствуют, что относительное содержание (доля в сумме кислот) винной кислоты в винограде (в свежем сусле) выше, чем в концентрированном продукте. Это обусловлено удалением некоторого количества тартрат-аниона в виде калиевой и кальциевой солей, причем кристаллообра-

Таблица 1. Дегустационная характеристика подлинных продуктов виноградного и невинного происхождения

Table 1. Sensory profile of grape and non-grape authentic products

Показатель	Продукт				
	Свежее виноградное сусло	Концентрированное виноградное сусло	Яблочный концентрированный сок	Глюкозно-фруктозный сироп	Сахарный сироп
Цвет	от светло-соломенного до темно-золотистого	от светло-золотистого до темно-янтарного	от светло- до темно-золотистого	бесцветный	бесцветный
Аромат	характерный для свежего винограда, для мускатных сортов – с выраженным сортовым тоном	от слабо- до сильно выраженных тонов уваренности, в некоторых случаях с сохранением сортового аромата	характерный для яблочного сока	без запаха	свойственный сахарному раствору
Вкус	кисло-сладкий	выраженный кисло-сладкий с тонами винограда и сухофруктов в послевкусии	кисло-сладкий с оттенком яблочного сока в послевкусии	сладкий	сладкий

Таблица 2. Сравнительная характеристика критериальных показателей подлинности продуктов виноградного и невинградного происхождения

Table 2. Authenticity criteria for grape and non-grape products: comparative analysis

Продукт	n, шт.	Среднее значение показателя и его отклонение в пределах исследуемой выборки				
		Доля ВК, %	Доля ЛК, %	Доля Дс, %	ГФИ	pH
Опытные образцы						
Свежее виноградное сусло	250	68 ± 26	2,7 ± 2,6	0,5 ± 0,5	0,94 ± 0,06	3,0 ± 0,3
Концентрированное виноградное сусло	6	50 ± 11	8,3 ± 1,7	0,12 ± 0,09	0,91 ± 0,04	3,2 ± 0,2
Сахарный сироп	4	н/д	н/д	93,0 ± 7,0	1,03 ± 0,05	5,3 ± 0,2
Промышленные образцы, выработанные под научным сопровождением						
Подлинное концентрированное виноградное сусло, выработанное на 100 % из винограда	13	38 ± 18	5,0 ± 4,5	0,2 ± 0,2	0,87 ± 0,13	3,2 ± 0,3
Промышленные образцы, реализуемые на винодельческом рынке России						
Подлинное концентрированное виноградное сусло, выработанное на 100 % из винограда	109	45 ± 29	7,0 ± 6,5	0,5 ± 0,5	0,87 ± 0,14	3,2 ± 0,6
Концентрат яблочного сока	3	н/д	4,4 ± 2,4	13,0 ± 3,0	0,60 ± 0,10	3,2 ± 0,3
Глюкозно-фруктозный сироп	4	н/д	н/д	3,1 ± 0,6	1,15 ± 0,20	4,0 ± 0,3
Продукт, заявленный как «Концентрированное виноградное сусло», не отвечающий критериям подлинности	57	50 ± 50	50,0 ± 50,0	25,0 ± 20,0	1,10 ± 0,10	2,9 ± 1,4

Примечание: n – количество образцов; ВК – доля винной кислоты в сумме содержания кислот (лимонной, винной, яблочной), %; ЛК – доля лимонной кислоты в сумме содержания кислот (лимонной, винной, яблочной), %; Дс – доля дисахаридов в сумме содержания сахаров (дисахаридов, глюкозы, фруктозы), %; ГФИ – соотношение содержания глюкозы к фруктозе; н/д – не диагностируется

Note: n – number of samples; ВК – tartaric acid in total acids (citric, tartaric, malic), %; ЛК – citric acid in total acids (citric, tartaric, malic), %; Дс – disaccharides in total sugars (disaccharides, glucose, fructose), %; ГФИ – glucose vs. fructose; н/д – not identified

зование может начаться уже в процессе концентрирования и продолжиться при хранении готового продукта [1, 33]. Количество выведенной из системы винной кислоты будет существенно отличаться и зависеть от комплексного влияния ряда факторов: исходной концентрации самой кислоты и солеобразующих катионов в винограде; технологии обработки свежего сусла; режимов его концентрирования; механического воздействия, провоцирующего рост кристаллов; температуры хранения готового продукта и др. В виноградной ягоде синтезируется незначительное количество лимонной кислоты (не более 5 % в сумме органических кислот). В процессе концентрирования ее доля в общем содержании кислот возрастает за счет удаления винной кислоты, но при этом не превышает 14 %.

Соотношение глюкоза:фруктоза для свежего сусла (винградного сока) составляет не более 1,0, а доля дисахаридов в пересчете на сахарозу – не более 1,0 %, что соответствует данным, представленным в литературе, эти же особенности сохраняются после концентрирования сусла [1, 7, 8]. Более высокое значение глюкозно-фруктозного сиропа в винограде наблюдается редко, например при низкой сахаристости ягод. Однако для производства концентрированного сусла использование данного сырья невыгодно экономически, т. к. это значительно увеличивает энергозатраты на удаление влаги и достижение необходи-

мого содержания сахаров, обеспечивающего микробиологическую стабильность. В низкосахаристом винограде наблюдается высокое содержание винной кислоты, что требует ее предварительного удаления, в противном случае избыток данного вещества приводит к активной кристаллизации битартата калия. Последующее применение такого продукта в виноделии имеет существенный недостаток: в процессе хранения наблюдается его расслоение, концентрация сахаров и кислот в объеме становится неравномерной, что затрудняет технологические расчеты, необходимые для обеспечения требуемых условий виноматериала в соответствии с нормативно-технической документацией.

Значения pH в свежем и концентрированном сусле составляют 2,7–3,3 и 2,6–3,8 соответственно. В сиропах этот показатель несколько выше, но несмотря на отсутствие органических кислот, pH находится в пределах слабокислой среды, т. к. в процессе производства кислотность / щелочность регулируется разрешенными приемами в соответствии с требованиями к условиям проведения технологического процесса. Значения pH достаточно сильно перекрываются во многих исследованных объектах, что не позволяет отнести данный показатель к основным, однако их существенные отклонения от установленных границ во всех случаях сопровождались нарушением

профиля кислот и сахаров, поэтому он может служить для дополнительного подтверждения фальсификации продукта.

Из представленных данных следует, что оригинальный продукт, выработанный исключительно из свежего виноградного суслу путем концентрирования, характеризуется значениями: доля винной и лимонной кислот в сумме органических кислот – не менее 16 % и не более 14 % соответственно; глюкозо-фруктозный индекс – не более 1,01; доля дисахаридов в общем содержании сахаров – не более 1,0 %; pH – 2,7–3,8.

Концентрат яблочного сока отличался более высокой долей дисахаридов (в среднем 13 %), преобладанием фруктозы над глюкозой, что снижает соотношение глюкоза:фруктоза (в среднем 0,6); винная кислота, нехарактерная для данной группы семечковых культур, достоверно не диагностируется. Полученные данные совпадают с информацией, представленной в источниках литературы [8, 34]. В глюкозно-фруктозном сиропе, по сравнению с виноградным продуктом, установлено более высокое содержание дисахаридов (в среднем 3,1 % в сумме сахаров), представленных мальтозой, и глюкозно-фруктозного индекса, превышающего 1,0, при этом органические кислоты не обнаружены [35].

Для повышения надежности выводов и поиска дополнительных критериев подлинности исследования будут продолжены с привлечением дополнительных высокотехнологичных методов исследований, таких как атомно-адсорбционная спектроскопия и ядерно-магнитный резонанс.

**Фальсифицированные образцы.** В образцах, заявленных как концентрированное виноградное суслу, но не соответствующих критериям натурального виноградного продукта, все характеристики имеют более широкий диапазон варьирования. Примеры физико-химических и органолептических показателей некоторых образцов, представленных в исследовании, приведены в таблицах 3 и 4 (жирным шрифтом выделены значения показателей, отклоняющихся от установленных диапазонов для подлинных образцов). Образец № 1 имел типичные физико-химические и органолептические показатели, свойственные виноградному суслу.

Отклонение дегустационных характеристик от типичных свойств аутентичных виноградных продуктов подтверждает полученные аналитические данные: в образцах № 2–6, по сравнению с № 1, отмечены несоответствия в аромате, цвете и вкусе продуктов. Фальсификаты отличались разнообразными отклонениями и разбросом значений. Образец № 2 содержал значительное количество дисахаридов (10 %), что существенно выше, чем может быть в виноградном продукте; отличался слабовыраженным цветом, ароматом и кислотностью во вкусе. В образце № 3 недостаточное количество винной кислоты сопровождалось высокой долей лимонной кислоты и дисахаридов, которые в винограде присутствовали незначительно, в аромате отмечен навязчивый тон ароматизатора (имитация суслу, выработанного из винограда мускатных тонов, которое в концентрированном виде имеет менее выраженные и более сложные сортовые свойства). Отклонение всех аналитических параметров свидетельствует о вероятном купаже сахаросодержащих продуктов виноградного и невинородного происхождения с добавкой ароматизатора.

Образец № 4 имел высокое содержание лимонной кислоты (5 г/кг), которая при отсутствии катионов обуславливала низкое значение pH (1,5). При этом он обладал слишком светлым цветом, в аромате отмечены нехарактерные тона карамелизованного сахара, который, вероятно, применялся для придания цвета изначально бесцветной жидкости; во вкусе отметили резкую кислотность. В образце № 5 кислотность была обусловлена исключительно винной кислотой, в данном случае pH находится в допустимом диапазоне; сахара представлены в основном сахарозой с незначительным содержанием глюкозы и фруктозы в равном количестве. По дегустационной характеристике данный образец близок к № 4: в аромате типичная гамма отсутствует, отмечались тона сахарного сиропа; кислотность негармоничная, но менее выражена, чем в образце № 4, что связано с меньшим содержанием винной кислоты (2 г/кг), а также ее менее резким кислым вкусом, по сравнению с лимонной кислотой. Комплекс признаков позволял предположить, что эти продукты являются глюкозно-фруктозным и сахарным сиропами соответственно.

Таблица 3. Примеры значений физико-химических показателей подлинного и фальсифицированных образцов концентрированного виноградного суслу

Table 3. Authentic vs. adulterate concentrated grape must samples: physicochemical variables

Показатель	Образцы					
	№ 1 (подлинный)	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
pH	3,1	3,5	<b>2,4</b>	<b>1,5</b>	3,0	<b>4,0</b>
Доля винной кислоты, %	42,0	30,0	14,0	<b>0</b>	<b>100,0</b>	<b>0</b>
Доля лимонной кислоты, %	4,0	2,0	<b>25,0</b>	<b>100,0</b>	0	<b>30,0</b>
Глюкозно-фруктозный индекс	0,96	0,91	1,0	<b>1,11</b>	0,99	<b>0,45</b>
Доля дисахаридов в сумме сахаров, %	0,4	<b>10,0</b>	<b>4,0</b>	<b>3,0</b>	<b>97,0</b>	<b>11,0</b>

Таблица 4. Примеры дегустационной характеристики фальсифицированных образцов концентрированного виноградного сусла

Table 4. Sensory profiles of adulterate concentrated grape must

Показатель	Образцы					
	№ 1 (подлинный)	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Цвет	светло-янтарный	соломенный	светло-соломенный	золотистый	светло-золотистый	темно-янтарный
Аромат	типичные тона выражены	типичные тона слабо выражены	типичные тона слабо выражены, интенсивный тон ароматизатора, имитирующего аромат мускатного винограда	типичные тона отсутствуют, интенсивный тон жженого сахара	типичные тона слабо выражены, тон сахарного раствора	типичные тона слабо выражены, тон яблочного сока
Вкус	типичный кисло-сладкий	приторно сладкий с невыраженной кислотностью	кисло-сладкий	приторно сладкий с резко выраженной кислотностью	приторно сладкий с выраженной кислотностью	кисло-сладкий с оттенком яблочного сока в послевкусии

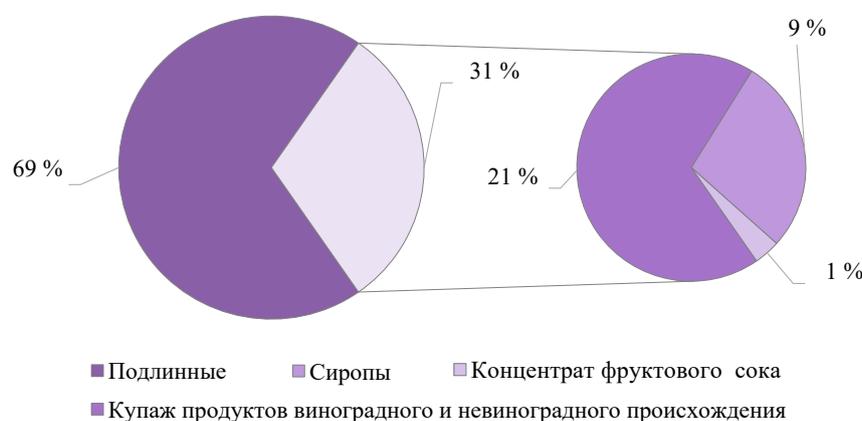


Рисунок 1. Результаты идентификации образцов концентрированного виноградного сусла, поступивших на исследование

Figure 1. Identification of concentrated grape must samples

Образец № 6 имел профиль сахаров, характерный для плодов яблок – низкий глюкозно-фруктозный индекс и высокую долю дисахаридов, которые в совокупности с ярко выраженными характерными тонами в аромате и вкусе позволяли предположить, что это концентрированный яблочный, а не виноградный сок (сусло).

Таким образом, модификация состава продукта разнообразными «основами» (подмена или добавка компонентов другой природы) приводит к изменению значений физико-химических показателей. Подкисление сиропов винной и/или лимонной кислотой в сочетании с внесением сахарного колера в качестве натурального подкрашивающего агента; подмена концентрированного сока из винограда на сок других плодов; купаж перечисленных продуктов в различных пропорциях выявляется сдвигом типичных диапазонов критериев. Обобщение полученных данных

показало, что из 179 образцов, поступивших на исследование, 69 % полностью соответствуют продукту, выработанному исключительно из винограда. Остальные представляют собой: плодовые концентрированные соки – 1 %, глюкозно-фруктозный и сахарный сиропы – 9 %; купаж указанных продуктов с аутентичным продуктом виноградного происхождения – 21 % (рис. 1). Треть исследованных образцов отнесены к фальсификатам, что не позволяет использовать их для производства вин. Значительная доля ненатуральных образцов свидетельствует о высоких рисках виноделов выпустить на рынок фальсифицированную винодельческую продукцию, что может быть установлено при ее последующей экспертизе [32].

**Влияние концентрированного сусла на стабильность виноматериалов.** На втором этапе работы проведены исследования по влиянию образцов концентрированного сусла с подтвержденным виноградным

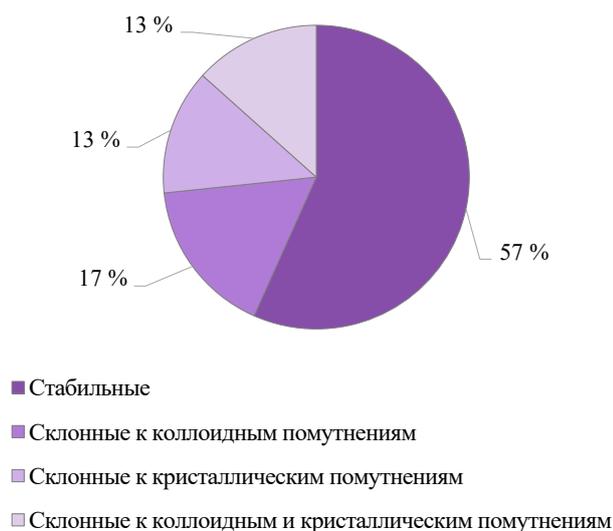


Рисунок 2. Изменение склонности виноматериалов к помутнениям после внесения концентрированного суслу

Figure 2. Opacity after adding concentrated must

происхождением на коллоидную и кристаллическую стабильность подслащенного виноматериала. Всего было испытано 30 производственных образцов концентрированного суслу различных производителей (рис. 2). Результаты показали, что после его внесения, в 43 % случаев проявилась склонность виноматериалов к различной дестабилизации: к необратимым коллоидным помутнениям – 17 %; к кристаллической дестабилизации – 13 %; комбинированная склонность – 13 %. Это связано с привнесением веществ белковой природы, винной кислоты и калия; содержание указанных компонентов ожидаемо повышается при концентрировании недостаточно подготовленного свежего суслу, что становится критическим при добавке такого продукта в виноматериал. После обработки вспомогательными препаратами (раствор желатина, суспензия бентонита) полусладкие виноматериалы были стабилизированы, что было подтверждено отрицательными результатами теста на склонность к необратимым коллоидным помутнениям. Не потребовалось применение дополнительных препаратов (ферменты протеазного действия) или приемов (нагрев), рекомендованных для удаления белков из «трудных» вин [36]. Обработка опытных образцов холодом позволила спровоцировать кристаллизацию битартрата калия и выпадение его в осадок с сохранением органолептических характеристик виноматериала, что является общепринятым подходом в виноделии [37].

На факт повышения склонности продукции к появлению помутнения и/или осадка виноделам необходимо обратить пристальное внимание, т. к. отсутствие должной обработки виноматериалов перед розливом сохраняет в вине вещества, поступившие в составе

концентрированного суслу, что в дальнейшем способно приводить к нарушению внешнего вида готовой продукции. Важным моментом является подготовка свежего суслу для дальнейшего концентрирования: в случае предварительной обработки препаратами пектиназного свойства готовый продукт содержит меньшее количество взвесей и мутящих частиц [1, 38]. Это обусловлено тем, что ферментативная фрагментация пектина разрушает макромолекулы с образованием более мелких осколков, не препятствующих самоосветлению (осаждению взвешенных частиц) и фильтрации суслу [39]. Удаление высокомолекулярных соединений, обладающих протекторным действием к формированию кристаллов битартрата калия, способствует более быстрому осаждению виннокислой соли в концентрированном виноградном сусле, что делает применение такого продукта менее «рискованным» для последующей кристаллической стабильности вина [1].

В случае применения вакуум-установок для получения концентрированного виноградного суслу процесс необходимо проводить в условиях низкого температурного режима, что исключает окислительную полимеризацию фенольных веществ [40]. Это позволяет сохранить природный цвет продукта, т. к. окисленные фенольные компоненты обладают более коричневыми оттенками, в случае их попадания в вино наблюдается нежелательное искажение цвета – утрата соломенных тонов с проявлением золотистых или рыжеватых. Из данных, приведенных в научной литературе, следует, что еще одним актуальным способом получения продукта с минимальным содержанием примесей является применение мембранной фильтрации [41]. Предложенных методических подходов необходимо придерживаться при внутреннем производстве концентрированного суслу на базе винодельческих предприятий.

## Выводы

В результате исследований концентрированного суслу, предлагаемого на винодельческом рынке России, выявлено высокое количество подделок (31 %). Установлено, что фальсификация аутентичного продукта происходит путем купажирования либо полной подмены невиноградными продуктами. В 43 % случаев подлинное суслу при использовании для подслащивания виноматериалов повышало их склонность к коллоидным и кристаллическим помутнениям.

На основании полученных данных предложена поэтапная оценка качества концентрированного виноградного суслу, что позволит обеспечить аутентичность и розливостойкость полусухих и полусладких вин. На первом этапе проводится идентификация образцов на основании показателей, характеризующих специфику углеводного и кислотного состава продукта виноградного происхождения: рН, расчетные показатели (глюкозно-фруктозный индекс, доля

дисахаридов в сумме сахаров, доли винной и лимонной кислот в сумме кислот). На втором этапе для образцов концентрированного суслу с подтвержденной подлинностью определяется влияние на стабильность виноматериалов по результатам тестов. В случае отсутствия розливостойкости требуется обязательная доработка виноматериалов перед розливом во избежание развития опала и появления осадка в готовой продукции.

#### Критерии авторства

Н. В. Гнилomedова – планирование исследований и обобщение результатов, подготовка статьи; А. В. Весютова, М. В. Ермихина, В. А. Олейникова – получение и обработка первичных аналитических данных; Н. С. Аникина – редактирование статьи и формулирование выводов.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам Всероссийского национального научно-исследова-

тельского института виноградарства и виноделия «Магарах» РАН Д. Ю. Погорелову и Е. А. Сластие за помощь в определении компонентного состава винограда и виноматериалов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

#### Contribution

N.V. Gnilomedova – research planning and generalization of results, preparation of the article; A.V. Vesuytova, M.V. Ermikhina, V.A. Oleinikova – obtaining and processing primary analytical data; N.S. Anikina – editing the article and formulating conclusions.

#### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

#### Acknowledgments

The authors express their gratitude to the staff of the All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" of the Russian Academy of Sciences D.Y. Pogorelov and E.A. Slastie for their help in determining the component composition of grapes and wine materials by high-performance liquid chromatography.

#### References/Список литературы

1. Gnilomedova NV, Mikheeva LA. Enochemical characteristic of concentrated grapes must. Proceedings of North Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russian Academy of Agricultural Sciences. 2017;13:124–129. (In Russ.). [Гнилomedова Н. В, Михеева Л. А. Энохимическая характеристика концентрированного виноградного суслу // Научные труды государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства российской академии сельскохозяйственных наук. 2017. Т. 13. С. 124–129.]. <https://elibrary.ru/ZMWFRX>
2. Yeganeh-Zare S, Farhadi Kh, Amiri S. Rapid detection of apple juice concentrate adulteration with date concentrate, fructose and glucose syrup using HPLC-RID incorporated with chemometric tools. Food Chemistry. 2021;370:131015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131015>
3. An JA, Lee J, Park J, Auh J-H, Lee C. Authentication of pomegranate juice using multidimensional analysis of its metabolites. Food Science and Biotechnology. 2021;30(13):1635–1643. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00995-9>
4. Calle JLP, Barea-Sepúlveda M, Ruiz-Rodríguez A, Álvarez JÁ, Ferreiro-González M, et al. Rapid Detection and Quantification of Adulterants in Fruit Juices Using Machine Learning Tools and Spectroscopy Data. Sensors. 2022;22(10):3852. <https://doi.org/10.3390/s22103852>
5. Rizk HA, Estephan J, Salameh C, Kassouf A. Non-targeted detection of grape molasses adulteration with sugar and apple molasses by mid-infrared spectroscopy coupled to independent components analysis. Food Additives and Contaminants: Part A. 2022;40(1):1–11. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2135766>
6. Dhaulaniya AS, Balan B, Sodhi KK, Kelly S, Cannavan A, Singh DK. Qualitative and quantitative evaluation of corn syrup as a potential added sweetener in apple fruit juices using mid-infrared spectroscopy assisted chemometric modeling. LWT. 2020;131:109749. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109749>
7. Li J, Zhang Ch, Liu H, Liu J, Jia Zh Profiles of Sugar and Organic Acid of Fruit Juices: A Comparative Study and Implication for Authentication. Journal of Food Quality. 2020;7236534. <https://doi.org/10.1155/2020/7236534>
8. Shobinger U. Fruit and vegetable juices: scientific foundations and technologies. Saint-Petersburg: Profession; 2004. 640 p. (In Russ.). [Шобингер У. Фруктовые и овощные соки: научные основы и технологии. СПб.: Профессия; 2004. 640 с.]
9. Global Flavoring Syrup and Concentrate Market Drivers, Trends and Restraints For 2022–2031 [Internet]. [cited 2023 Sept 15]. Available from: [https://iso.einnews.com/pr\\_news/608443757/global-flavoringsyrup-and-concentrate-market-drivers-trends-and-restraints-for-2022-2031](https://iso.einnews.com/pr_news/608443757/global-flavoringsyrup-and-concentrate-market-drivers-trends-and-restraints-for-2022-2031)

10. Kuzmina EI, Egorova OS, Akbulatova DR, Sviridov DA, Ganin MYu, Shilkin AA. New types of sugar-containing raw materials for food production. *Food Systems*. 2022;5(2):1454–156. (In Russ.). <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-2-145-156>; <https://elibrary.ru/JLQULI>
11. Russian market of glucose-fructose syrups: Analysis for 2021 [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <http://www.centripap.ru/report/food/Soy/gfs/>
12. Peschanskaya VA, Andrievskaya DV, Ulyanova EV. Prospects for the use of glucose-fructose syrups in the production of alcoholic beverages. *Beer and beverages*. 2021;(3):13–16. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/2072-9650-2020-10033>; <https://elibrary.ru/XVLKTN>
13. Scherer R, Rybka ACP, Ballus CA, Meinhart AD, Filho JT, Godoy HT. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*. 2012;135(1):150–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.111>
14. Spinelli FR, Dutra SV, Carnieli G, Leonardelli S, Drehmer AP, Vanderlinde R. Detection of addition of apple juice in purple grape juice. *Food Control*. 2016;69:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.005>
15. Orak HH. Determination of Glucose and Fructose Contents of Some Important Red Grape Varieties by HPLC. *Asian Journal of Chemistry*. 2009;21(4):3068–3072.
16. Coelho EM, da Silva Padilha CV, Miskinis GA, de Sá AGB, GE Pereira, de Azevêdo LC, *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018;66:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
17. Cornehl L, Krause J, Zheng X, Gauweiler P, Schwander F, Töpfer R, *et al.* Determination of Sugars and Acids in Grape Must Using Miniaturized Near-Infrared Spectroscopy. *Sensors*. 2023;23(11):5287. <https://doi.org/10.3390/s23115287>
18. Scutarășu EC, Teliban IV, Zamfir CI, Luchian CE, Colibaba LC, Niculaua M, *et al.* Effect of Different Winemaking Conditions on Organic Acids Compounds of White Wines. *Foods*. 2021;10(11):2569. <https://doi.org/10.3390/foods10112569>
19. Lodaya JD, Gotmare S. Determination of sugars in different grapes using high performance liquid chromatography–ELSD. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*. 2018;5(6):324–326.
20. Zhong H, Yadav V, Wen Z, Zhou X, Wang M, Han S, *et al.* Comprehensive metabolomics-based analysis of sugar composition and content in berries of 18 grape varieties. *Frontiers in Plant Science*. 2023;14:1200071. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1200071>
21. Paolini M, Perini M, Allari L, Tonidandel L, Finato F, Guardini K, *et al.* Myo-Inositol, Scyllo-Inositol, and Other Minor Carbohydrates as Authenticity Markers for the Control of Italian Bulk, Concentrate, and Rectified Grape Must. *Molecules*. 2023;28(8):3609. <https://doi.org/10.3390/molecules28083609>
22. Kliewer WM. Concentrations of Tartrates, Malates, Glucose and Fructose in the Fruits of Genus. *Vitis*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1967;18:87–96. <http://doi.org/10.5344/ajev.1967.18.2.87>
23. Amerine MA, Thoukis G. The Glucose-Fructose Ratio of California Grapes. *Vitis*. 1958;1(4):224–229. <https://doi.org/10.5073/vitis.1958.1.224-229>
24. Huang X-Y, Jiang Z-T, Tan J, Li R. Geographical Origin Traceability of Red Wines Based on Chemometric Classification via Organic Acid Profiles. *Journal of Food Quality*. 2017;2038073. <https://doi.org/10.1155/2017/2038073>
25. Ostroukhova EV, Peskova IV, Pogorelov DYu. The organic acid profile of white grapes varieties growing in Crimea. *Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2019;56:122–132. (In Russ.). <https://doi.org/10.30679/2219-5335-2019-2-56-122-132>; <https://elibrary.ru/YZMWUH>
26. Wang L, Zhou W, Liu Ch, Chen P, Zhou L. Study on the accumulation pattern of anthocyanins, sugars and organic acids in medicinal *Vitis vinifera* ‘SuoSuo’ during ripening. *Food Chemistry*. 2023;433:137294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137294>
27. Kalmykova NN, Kalmykova EN, Gaponova TV. Characteristic of organic acids composition of musts and wines from red grapevine varieties of interspecific origin. *Russian grapes*. 2022;20:59–64. (In Russ.). <https://doi.org/10.32904/2712-8245-2022-20-59-64>; <https://elibrary.ru/ONDDZK>
28. Furlani MVM, Maturano YP, Combina M, Mercado LA, Toro ME, Vazquez F. Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Research*. 2017;17(2):fox010. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox010>
29. Skorikova TK, Tanashchuk TN, Shalamitskiy MYu. Evaluating of *saccharomyces* yeast ability to use glucose or fructose in the kind of carbon source. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2017;(4):44–45. (In Russ.). [Скорикова Т. К., Танащук Т. Н., Шаламитский М. Ю. Оценка способности дрожжей рода *saccharomycetes* использовать в качестве источника углеводов глюкозу и фруктозу // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2017. № 4. С.44–45.]. <https://elibrary.ru/ZWLJTN>
30. Wang H, Tang J, Lv J, Wang X, Sun H. Physiological and transcriptomic insights into sugar stress resistance in osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Food Microbiology*. 2024;117:104395. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104395>
31. Anikina NS, Gnilomedova NV, Gerzhikova VG. Rationale for the criteria used to confirm the origin of concentrated grape musts. *Viticulture and Winemaking*. 2016;46:62–65. (In Russ.). [Аникина Н. С., Гниломедова Н. В., Гержикова В. Г.

Обоснование показателей для подтверждения виноградного происхождения концентрированного суслу // Виноградарство и виноделие. 2016. Т. 46. С. 62–65.]. <https://elibrary.ru/XEFYJJ>

32. Gnilomedova NV, Anikina NS, Gerzhikova VG. Profile of sugars in a grape-wine system as the identifying indicator of the authenticity of wine products. *Foods and Raw Materials*. 2018;6(1):191–200. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-1-191-200>; <https://elibrary.ru/XQVNMT>

33. Gordeeva LN. Organic acids in concentrated grape must products. *Food and Processing Industry. Abstract Journal*. 2002;(4):1517. (In Russ.). [Гордеева Л. Н. Органические кислоты в продуктах из концентрированного виноградного суслу // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журнал. 2002. № 4. С. 1517.]. <https://elibrary.ru/FOAIQB>

34. Suprun NP, Gusakova GS, Anikina NS, Slastya EA. Biochemical composition of fruit must from small-fruit apple varieties grown in the Southern Baikal Region. *Proceedings Of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023; 13(4):611–620. (In Russ.). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-4-611-620>; <https://elibrary.ru/FFIUJW>

35. Dhaulaniya AS, Balan B, Sodhi KK, Kelly S, Cannavan A, Singh DK. Qualitative and quantitative evaluation of corn syrup as a potential added sweetener in apple fruit juices using mid-infrared spectroscopy assisted chemometric modeling. *LWT*. 2020;131:109749. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109749>

36. Sui Y, Wollan D, McRae JM, Muhlack R, Capone DL, Godden P, *et al*. Chemical and Sensory Profiles of Sauvignon Blanc Wine Following Protein Stabilization Using a Combined Ultrafiltration/Heat/Protease Treatment. *Frontiers in Nutrition*. 2022;(9):799809. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.799809>

37. Xia N, Cheng H, Yao X, Pan Q, Meng N, Yu Q. Effect of Cold Stabilization Duration on Organic Acids and Aroma Compounds during *Vitis vinifera* L. cv. Riesling Wine Bottle Storage. *Foods*. 2022;11(9):1179 <https://doi.org/10.3390/foods11091179>

38. Campos PRF, Módenes AN, Espinoza-Quiñones FR, Trigueros DEG, Barros STD, Pereira NCS. Improvement on the concentrated grape juice physico-chemical characteristics by an enzymatic treatment and Membrane Separation Processes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2016;88(1):423–436. <http://doi.org/10.1590/0001-3765201620140136>

39. Kondratenko VV, Kondratenko TYu, Petrov AN. Directed homoenzymatic fragmentation of the plant protopectin complex: Assessment criteria. *Foods and Raw Materials*. 2021;9(2):254–261. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-254-261>; <https://elibrary.ru/XMIRHQ>

40. Kulikova NE, Chernobrovina AG, Roeva NN, Popova OYu. Evaporation as a Method for Obtaining Plant Concentrates. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(2):335–346. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-2-2438>; <https://elibrary.ru/VCQEQM>

41. Haile S, Masi C, Tafesse M. Isolation and characterization of pectinase-producing bacteria (*Serratia marcescens*) from avocado peel waste for juice clarification. *BMC Microbiol*. 2022;22:145. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02536-8>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2541>  
<https://elibrary.ru/HASLLS>

Original article  
Available online at <https://fptt.ru/en>

## Agave Syrup in Traditional Indian Desserts: A Sensory Evaluation



Rizwan Yargatti<sup>ID</sup>, Arti Muley\*<sup>ID</sup>

Symbiosis International (Deemed University)<sup>ROR</sup>, Pune, Maharashtra, India

Received: 12.04.2024  
Revised: 07.05.2024  
Accepted: 04.06.2024

\*Arti Muley: [asstprofnd@ssca.edu.in](mailto:asstprofnd@ssca.edu.in),  
<https://orcid.org/0000-0001-9131-327X>  
Rizwan Yargatti: <https://orcid.org/0000-0001-7815-6900>

© R. Yargatti, A. Muley, 2024



### Abstract.

Sugar is among the least beneficial foods for health and is often referred to as a sweet poison due to its numerous health hazards. To address this issue, the food industry needs to explore, study, and shift to healthier food choices, such as agave syrup, which has a good potential as a natural sweetener. This study explores the acceptance level of traditional Indian desserts *seviyan kheer* and *rawa sheera* where sugar was substituted with agave syrup.

Sensory parameters were recorded for both the experimental samples and controls. The sensory evaluation involved two panels represented by culinary experts and semi-experts. The study included a nine-point hedonic scale test and a paired comparison test. Consumer acceptability was checked by calculating significant differences between the standardized formulations and the control samples.

*Seviyan kheer* made with agave syrup showed better acceptance rates in both expert and semi-expert panels ( $p > 0.05$ ). Both panels preferred the formulations with agave syrup. The results were confirmed by a high-reliability score (Cronbach's alpha = 0.925); no significant differences occurred between the controls and the experimental samples after consumer acceptability trials.

*Seviyan kheer* demonstrated a higher acceptance rate while *rawa sheera* was only marginally accepted. The results revealed a good potential of agave syrup as a substitute for sugar in traditional Indian desserts and helped to understand customers preferences for healthier sweeteners. The research also highlighted the value of sensory assessment in determining customer acceptability and provided guidance for future initiatives to create healthier food substitutes. Further research is needed to test the commercial viability and nutritive properties of agave syrup for a wider range of traditional Indian sweets with different combinations of ingredients.

**Keywords.** Agave syrup, Indian traditional sweets, sensory analysis, nutrient analysis, product development

**For citation:** Yargatti R, Muley A. Agave Syrup in Traditional Indian Desserts: A Sensory Evaluation. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):807–819. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2541>

## Органолептическая оценка традиционных индийских десертов с добавлением сиропа агавы



Р. Яргатти<sup>ORCID</sup>, А. Мулей\*<sup>ORCID</sup>

Симбиозис Интернешнел (Частный университет)<sup>ORCID</sup>, Пуна, Махараштра, Индия

Поступила в редакцию: 12.04.2024  
Принята после рецензирования: 07.05.2024  
Принята к публикации: 04.06.2024

\*А. Мулей: [asstprofnd@ssca.edu.in](mailto:asstprofnd@ssca.edu.in),  
<https://orcid.org/0000-0001-9131-327X>  
Р. Яргатти: <https://orcid.org/0000-0001-7815-6900>

© Р. Яргатти, А. Мулей, 2024



### Аннотация.

Сахар является вредным для человеческого организма продуктом, за что его часто называют «сладкий яд». Поиск замены сахара - актуальная область научных исследований в пищевой промышленности. Альтернативным натуральным подсластителем может служить сироп агавы. Цель исследования заключалась в проведении органолептической оценки традиционных индийских десертов «кхир севьян» (пудинг с вермишелью) и «рава шира» (пудинг из манки), в которых сахар заменяли сиропом агавы.

Органолептическую оценку проводили группой кулинарных экспертов и полужуров по девятибалльный гедонистической шкале и методом парной пробы, т. е. сравнительного анализа контрольного образца с экспериментальным. Потребительские качества проверяли путем расчета значимых различий между экспериментальными десертами, приготовленными по стандартизированным рецептурам, и контрольными образцами.

Десерт «кхир севьян», приготовленный с сиропом агавы вместо сахара, получил более высокую органолептическую оценку в обеих группах ( $p > 0,05$ ): как эксперты, так и полужуров предпочли десерты с сиропом агавы контрольным образцам, приготовленным с использованием сахара. Результаты получили высокую степень надежности (альфа Кронбаха = 0,925). Тест на потребительские качества не выявил существенных различий между контрольными и экспериментальными образцами. При этом образцы десерта «рава шира» с сиропом агавы получили более низкую органолептическую оценку.

В целом сироп агавы был расценен как перспективная замена сахара в традиционных индийских десертах. Данное исследование помогло выявить предпочтения клиентов в отношении натуральных подсластителей и продемонстрировало важность органолептической оценки в определении потребительских качеств инновационных продуктов питания. Описанная методика может быть использована в качестве образца для будущих исследований полезных заменителей традиционных пищевых компонентов. Перспективы введения сиропа агавы в массовое производство в составе данных блюд традиционной индийской кухни требуют дальнейшего изучения. Питательные свойства сиропа агавы могут быть исследованы на материале более широкого спектра традиционных индийских десертов с различными комбинациями ингредиентов.

**Ключевые слова.** Сироп агавы, индийские традиционные десерты, органолептическая оценка, анализ питательных свойств, разработка продуктов питания

**Для цитирования:** Яргатти Р., Мулей А. Органолептическая оценка традиционных индийских десертов с добавлением сиропа агавы // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 807–819. (На англ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2541>

### Introduction

Pure, white, and deadly, public health enemy number one, highly palatable, sweet poison: these are some of the unexaggerated nicknames given to sugar [1–5]. No equitable laws curb the production or usage of sugar in day-to-day food products in spite of the fact that the health hazards of high sugar intake are widely known [6–16]. It is associated with obesity [7] and hypertension [8], as well as with numerous metabolic, cardiovascular, and nervous disorders [9], not to mention many more clinical conditions. The reasons why people cannot just

stop consuming sugar are many: from capitalism, which governs the world economic dynamics, to simple consumerism philosophy [17]. One of the reasons is the absence of a perfect substitute. By perfect substitute, we mean that its availability, production, cost, utility, and health benefits should excel those of sucrose, commonly known as sugar.

Sucrose substitutes can broadly be classified into two main categories, i.e., artificial and natural. Artificial substitutes, or artificial sweeteners, add mere sweetness without any calories. Aspartame, Sucralose, and Neo-

tame are some examples, with Saccharin being the first one to be produced by Constantin Fahlberg in 1879. Natural sweeteners are further subdivided into nutritive and non-nutritive, or classified by source, i.e., plants, animals, or microbes. The most popular natural sweeteners are honey, maple syrup, and stevia [18]. Agave syrup is a natural sweetener. The principal byproducts of agave processing include juice, leaves, bagasse, and fibers [19]. Additionally, agave fructans demonstrate promising results as an encapsulating material that can prevent food ingredients from deteriorating [20].

Tequila and other alcoholic beverages are traditionally made in Mexico using a variety of plants from the *Agave* genus. Agave fructans are relatively new to the food industry. Due to their positive effects on human health, they have become quite popular as part of functional foods [21].

Agave syrup is produced by crushing the agave plant into fibers, from which juice is released by gravity, natural hydrolysis, and vacuum evaporation. About 10% of harvested agave is used for syrup production, while the remaining 90% goes to fermented and alcoholic beverages, e.g., Pulque, Tequila, and Mescal, which are usually produced from *Agave tequilana* and *Agave salmiana*. The process involves removing residue, increasing temperature, and removing excess moisture. Because agave syrup has a low glycemic index, it can be used in foods that primarily rely on sucrose. Chemical properties of agave syrup extracted from two most widely used agave species show that *Agave tequilana* contains 71–92% fructose, 4–15% glucose, and 4% sucrose, whereas *Agave salmiana* contains  $\geq 70\%$  fructose,  $\geq 25\%$  glucose, and  $\geq 2\%$  sucrose [22]. Agave sweet extract is gaining popularity due to its low glycemic index, as well as good antioxidant and antibacterial properties. It was reported to reduce plasma glucose and lipids, improve colon function, and increase calcium absorption. In addition, it demonstrated anticancer, anti-inflammatory, and ulcer-protective properties. The extract also showed antioxidant effects and was able to inhibit such bacteria as *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Based on recent research and commercial substitution, agave syrup has a strong chance of replacing sucrose in the near future, but further exploration is needed for its long-term health benefits and functional food status [23]. Agave fructans provide food producers with a number of technological benefits, such as soluble fiber, micro-encapsulation carriers, low-calorie sweeteners, fat substitutes, texture and viscosity modifiers, etc. Additionally, agave fructans enhance human health in a significant way by regulating microbial activity, glucose metabolism, and obesity [24]. They were reported to lower blood triglycerides, improve hyperglycemia, and increase body weight in several rodent studies [25].

**Commercialization of agave syrup. Agave as a sweetener in chocolate.** Patented low-moisture agave syrup allowed for the production of sugar-free, natural chocolate

that had good sensory properties and was stable at room temperature, i.e., it had the snap, luster, and flavor that consumers expect from chocolate [26].

Scientists compared the rheological, microstructural, and textural qualities of dark chocolates with natural substitutes (agave syrup and stevia) and traditional chocolates made with saccharose. The chocolate sample with the highest fat content and agave syrup substitute produced the smallest sugar crystal formation and had the lowest sugar levels. Because the rheometer employed was unable to quantify higher levels of viscosity, it demonstrated that the sample with less fat indicated stress [27].

**Agave nectar as a nutritional supplement.** Blue agave nectar was part of a dietary supplement with Omega-3 and Omega-6 fatty acids, which demonstrated a thermogenic effect and other health advantages [28].

**Agave syrup as a sweetener in pastry.** In muffins, agave syrup demonstrated a satisfyingly consistent structure. The syrup was used in place of or in addition to sucrose in gluten-free cakes, cereal bars, muffins, and cookies. The effects of agave syrup on the rheological, microstructural, and sensory qualities of baked goods remain understudied. As it was mentioned above, agave syrup proved quite effective in replacing sucrose in muffins; it yielded the best results in combination with xanthum gum and twice as much leavening agent [29].

**Agave plant fructans (agavins) as fat substitutes in dairy products.** Agavins were reported to provide low-fat or no-fat yogurt samples in a study that investigated agavins derived from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* for their physiochemical, rheological, and sensory characteristics. The experimental samples had excellent mouthfeel and texture while preserving the original sensory profile. However, the authors reported significant variations in the water retention capacity, syneresis, and viscosity. Every yogurt sample showed weak viscoelastic gel properties and strain thinning [30].

**Agave ingredients in granola bars.** Agave syrup, fructan sweeteners, and agave fiber could replace honey and flour in granola bars. Pulverized agave fiber was obtained as a byproduct of making agave syrup from the stems of *Agave tequilana*. The soluble agave dietary fiber that made up the body of granola bars was made from agave fructans and pulverized fiber [31].

**Agave as a sweetener in raspberry jam.** Jams made by mixing cooked fruits with sweeteners, i.e., sucrose, pectin, and acid, have always been a staple of human diet and nutrition. Saveski *et al.* [32] ascertained and evaluated the sensory variations that arose from replacing the sucrose in raspberry jams with other sweeteners, such as agave syrup. Sorbitol and agave syrup demonstrated better hedonistic qualities than sucrose and other sweeteners in raspberry jam.

**Agave as a sweetener in teriyaki sauce.** A Korean team substituted sugar with fructooligosaccharide, xylitol, erythritol, and agave syrup in teriyaki sauce to study how they affect consumers' health. They focused on

moisture content and viscosity. Xylitol proved to be an excellent addition to teriyaki sauce in terms of flavor and taste [33].

**Agave as a sugar and fat substitute in ice-cream.** Agave fructans improved the sensory, thermal, and textural properties of ice-cream, highlighting the fact that agave is a feasible fat and sugar replacer [34].

**Agave fructans with spray-dried pineapple and mango powder.** Jimenez-Sánchez *et al.* studied the effect of native agave fructans on the physiochemical profile of spray-dried pineapple and mango powder [35]. In conjunction with maltodextrin as stabilizers, they had a positive effect on the physiochemical characteristics of the fruit powder during drying. However, high concentrations altered the physiochemical profile of the powders during storage at room temperature. Under unpredictable storage conditions, fructans led to glueyness and unwanted accumulations, thus increasing hygroscopicity and water retention of the final product.

**Agave nectar in tequila and tequila-based spirits.** Agave nectar was reported to enhance the natural flavor of tequila or tequila-like beverages [36].

**Agave syrup in maqui gel.** Maqui berries are rich in antioxidants and have good anti-atherosclerotic properties. Sobaszek *et al.* substituted beet sugar with agave syrup in maqui gel to maximize the sensory, textural, and antioxidant qualities [37]. Agave syrup proved to be a superior substitute for beet sugar in terms of increasing the antioxidant activity of gels when citric acid was added at a 0.5% concentration.

**Ashen and green agave bagasse in functional cookies.** The research featured the physical properties of cookies, as well as the functional and chemical characteristics of agave bagasse. Agave bagasse increased the oil-holding capacity of the cookies and transferred prebiotic fructooligosaccharides to both agave bagasse formulations. They remained active as a prebiotic ingredient after *in vitro* digestion and thermal treatment. Ashen and green agave bagasse demonstrated beneficial chemical and functional properties for the food industry. Therefore, agave bagasse may be a good substitute to other dietary fibers in healthy diets [38].

The abovementioned experimental studies illustrate the various uses of agave syrup in food products. However, a few important points need to be taken into account prior to general acceptance. In-depth studies of the sensory impact are often insufficient, especially when it comes to flavor, texture, and general customer acceptability. Whether agave-based substitutes can accurately mimic the sensory experience of conventional products remains an open question without extensive sensory analyses.

Furthermore, the long-term effect of agave syrup on human health remains understudied, even though it may be healthier than that of conventional sweeteners, e.g., sucrose. More research is required to clarify any possible negative consequences, particularly in light of the gro-

wing worries about the connection between excessive sugar consumption and some health issues.

India is sometimes called the diabetic capital of the world. One out of every five people suffering from diabetes in the world is Indian; a staggering estimation of 70 million Indians with diabetes is projected for 2025. Asian Indian phenotype presupposes such reasons as hereditary genes, dietary patterns, low physical activity, and low body mass index [39]. Traditionally, any celebration in India is considered incomplete without sweets. It is customary to sweeten the mouth after every meal, happy occasion, religious holiday, party, etc. Offering sweets to God is required on all religious occasions [40]. In fact, sugar was invented in India, which was recorded in Atharva Veda. The word sugar itself was derived from *sharkara*, a Sanskrit word for gravel. The army of Alexander the Great was surprised to discover another source of sweetening in the form of sugar. They described it as a reed that gives honey without bees. Indian culture, customs, and beliefs have all revolved around sugar and sweet dishes since ancient times. Dietary guidelines for Indians advocate consuming no more than 10% of daily energy from sugar, or even less.

Easy availability and liking towards westernized culture due to globalization has increased the sugar consumption levels among Indians [41]. A study conducted in four cities of India (Delhi, Bangalore, Agra, and Pune) on school children aged 9–18 years projected a high consumption pattern of sweetened food items among children and their mothers. In fact, they considered any food that was prepared hygienically and packaged properly as healthy. At the time of festivals in India, people engage themselves in purchasing clothes, jewelry, accessories, and sweets. Buying and distributing sweets is part of every festival. Start-up date for any new business or important activities are purposely kept on festival dates as they are considered to be good luck. All these important activities increase the consumption of sweets on a national level [42]. If earlier more focus was on traditional Indian sweets as gift items during festivals, the current changes in social circumstances and cultural submergence have evolved new patterns in edible gifts [43]. Sweets prepared from milk are an integral part of the culinary habits all over India [44]. However, people of young generation look at price and calorie content when selecting sweets [45]. Shifting to healthy alternatives in food choices seems to be a promising part of the solution.

Yet, Indian people of all ages indulge in sweets on both regular days and special occasions [46]. This study concentrates on developing new products by replacing sucrose with agave syrup, as well as on the sensory evaluation of some traditional Indian sweets. In addition, an attempt was made to check its nutrient profiling for the overall consumer acceptability. The study featured *rawa sheera* and *seviyan kheer* as two traditional Indian desserts.

### Study objects and methods

The research objective was to evaluate the acceptability of classic Indian desserts *rawa sheera* and *seviyan kheer* produced with agave syrup against control samples with sugar. The sensory evaluation was a combination of a nine-point hedonic scale and paired comparison test on experts and semi-experts. The nine-point hedonic scale is an internationally recognized scale with nine verbal categories and a neutral category in the middle. It includes adjectives ranging from disliked extremely to like extremely and may or may not have numerical scores to indicate the strength of each term [47]. The paired comparison is one of the most popular sensory discrimination tests used in sensory science because of its simplicity. It only involves assessing two samples at a time, which significantly reduces the effect of fatigue, carry-over, and memory issues compared to assessing three or more samples [48]. The analysis of nutrients and contaminants followed the protocols established by the Food Safety and Standard Authority of India (FSSAI) and ISO 9001:2008 for examining nutrient content and contamination in accredited laboratories. Examining contaminants and residues in developed samples was the rationale. The acquired values were compared with the standards adopted in India.



Figure 1. Ingredients: a – for *rawa sheera*, b – for *seviyan kheer*

Рисунок 1. Ингредиенты: а – десерт «рава шира», б – десерт «кхир севиан»

All ingredients (Fig. 1) were purchased from a local food store in Pune City, Maharashtra: agave syrup (Mexican blue agave syrup), ghee (Govind Ghee), *seviyan* (Ganesh Seviyan Roasted), *rawa* (GSD Suji Rawa), sugar, dried fruit, milk, cardamom powder, and nutmeg.

The Foundation Training Kitchen at the Symbiosis School of Culinary Arts and Nutritional Sciences, Pune, was used to standardize the formulations with six culinary-trained volunteers who did the cooking and preparations for the sensory evaluations. The set-up for the sensory evaluation was arranged as per standard protocol, i.e., four rows of tables and chairs were set at equal distances from each other to avoid biased responses (Fig. 2).

**Sensory evaluation.** The sensory evaluation involved ten semi-trained experts and ten culinary experts. The semi-trained experts panel consisted of administrative employees and students (18–50 y.o.) from Symbiosis School of Culinary Arts and Nutritional Sciences, who regularly consume sweets and come from different socio-economic backgrounds. The expert participants were professional chefs and hospitality veterans with expert knowledge of the sensory attributes of sweets. Both semi-expert and expert panels were briefed about the study and the sensory evaluation procedure. The board of the classroom where the sensory evaluation took place displayed the objective of the study; hard copies of basic process on how to examine food appearance and taste were on every table along with a glass of water and a bowl of tomato wedges as palette cleanser. The same information was announced at the briefing. A 30-gram sample of *rawa sheera* with sucrose (control), *rawa sheera* with agave syrup (test sample), *seviyan kheer* with sucrose (control), and *seviyan kheer* with agave syrup (test sample) were portioned in disposables and coupled with a bowl of tomato wedges as a palette cleanser to the panelists. The blind samples were assessed using a paired comparison test and a nine-point hedonic scale ranging from 1 point (dislike extremely) to 9 points (like extremely).

The panelists were provided with written informed consent which was reviewed and signed by them before



Note. All panelists provided their consent for the reprinting of their images for this research and publication.

Figure 2. Sensory evaluation procedure: a – Foundation Training Kitchen at Symbiosis School of Culinary Arts and Nutritional Sciences, b – Product tasting and response recording

Рисунок 2. Процедура органолептической оценки: а – базовая учебная кухня, отделение кулинарии Международного университета Симбиоза, б – дегустация и оценка

the tasting. Ethical clearance was not required since our study focused on utility of agave as replacement with respect to sensory properties and did not involve nutritive and health-related impact.

**Formulations and preparation. Rawa sheera (control).** Semolina was gently dry-roasted at 140°C for 3 min. After that, 4 g of melted ghee and boiling water were combined to create a combination with a water-to-rawa ratio of 1:5. The toasted semolina was gradually added to this boiling mix while stirring. Then, we added sugar and more ghee, along with nutmeg and green cardamom powder to enhance the texture. A thorough mixing guaranteed that every component was distributed evenly. Finally, the finished product was adorned with almonds and pistachios that had been blanched and finely chopped.

**Rawa sheera (test sample).** The components and methods were identical to those of the control sample, but sugar was replaced with agave syrup (Fig. 3). Three pre-standardization trials made it possible to determine the proportion of agave syrup in the formulation. The share of agave syrup was gradually increased to match the



Figure 3. *Rawa sheera*: a – with sugar, b – with agave syrup

Рисунок 3. Десерт «рава шира»: а – с сахаром, б – с сиропом агавы

Table 1. Informal trials to standardize *rawa sheera* formulation with agave syrup

Таблица 1. Стандартизация рецептуры десерта «рава шира» с сиропом агавы вместо сахара

Ingredient	Trial 1 (Reference control sample), %	Trial 2, %	Trial 3 (Standardized mix), %
Rawa	16.67	16.67	16.67
Water	83.33	83.33	83.33
Ghee	6.40	6.15	5.93
Agave syrup	20.00	23.08	25.93
Green cardamom powder	1.20	1.15	1.11
Nutmeg	0.40	0.38	0.37
Pistachio	1.60	1.54	1.48
Almond	1.60	1.54	1.48
Total mass	100	100	100

sweetness to that of the control sample. The expert panel tested the sweetness during the informal trails. In the third attempt, the experts concluded it to be the closest in terms of sweetness to the control sample with sugar. The proportions of rawa and water were consistent (1:5), and other ingredients were adjusted to a common denominator of 100% (Table 1).

**Seviyan kheer (control).** We sautéed dried fruits in 4 g of melted ghee in a skillet till they acquired a pleasant golden color. After bringing milk to a mild boil in the same pan, we added roasted vermicelli at a ratio of 1:10. Periodical stirring prevented the vermicelli from adhering to the pan. The vermicelli was cooked in the milk until it was soft and had absorbed the liquid well. It took the vermicelli about 8 min for to absorb the milk and reach the appropriate suppleness. Then, we added sugar at a ratio equal to the amount of cooked vermicelli. The kheer was vigorously stirred with the mix until all of the sugar dissolved. The sautéed dried fruits were added as a garnish to the *seviyan kheer*, giving it a palatable and visually attractive look.

**Seviyan kheer (test sample).** The components and methods were identical to the control sample, but sugar was substituted with agave syrup. In an effort to standardize the *seviyan kheer*, we experimented with various combinations and proportions of agave syrup. Three pre-standardization trials made it possible to determine the correct proportion of agave syrup in the formulation. Agave syrup was gradually increased to match the sweetness of the control sample. The expert panel tested the sweetness during the informal trails. In the third attempt, the experts concluded it to be the closest in terms of sweetness to the control sample with sugar (Fig. 4). The ingredients in Table 2 were standardized to 100% total mass, making it easier to compare between trials.

## Results and discussion

**Nine-point hedonic scale test.** The statistical analysis involved a nine-point hedonic scale test with SPSS version 23. Student’s t-test was applied to analyze the variance in the means of all the criteria (appearance, color, taste, flavor, smell, aftertaste/mouthfeel, and overall

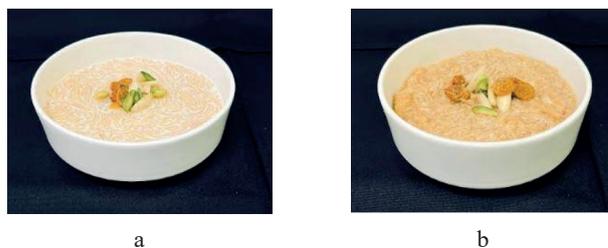


Figure 4. *Seviyan kheer*: a – with sugar, b – with agave syrup

Рисунок 4. Десерт «кхир севяян»: а – с сахаром, б – с сиропом агавы

Table 2. Informal trials to standardize *seviyan kheer* with agave syrup

Таблица 2. Стандартизация рецептуры десерта «кхир севяян» с сиропом агавы вместо сахара

Ingredient	Trial 1 (Reference control sample) %	Trial 2, %	Trial 3 (Standardized mix), %
Vermicelli	7.27	7.21	7.14
Ghee	1.45	1.44	1.43
Agave syrup	7.27	7.93	8.57
Green cardamom powder	0.44	0.43	0.4
Milk	72.67	72.05	71.43
Water	7.27	7.21	7.14
Raisin	1.45	1.44	1.43
Pistachio	1.16	1.15	1.14
Almond	1.16	1.15	1.14
Total mass	100	100	100

Table 4. Mean score for sensory attributes for *seviyan kheer*: control vs. agave syrup sample

Таблица 4. Средний балл по результатам органолептической оценки десерта «кхир севяян»: экспериментальный образец с сиропом агавы и контрольный образец с сахаром

Characteristics	Mean ± SD		p-value
	Control	Agave syrup	
Appearance	7.52 ± 0.81	8.05 ± 0.86	0.05
Color	7.29 ± 1.05	7.90 ± 0.94	0.052
Taste	7.10 ± 1.41	7.90 ± 0.99	0.03*
Flavor	7.0 ± 1.26	7.76 ± 0.88	0.02*
Smell	7.05 ± 1.96	7.43 ± 1.24	0.45
Overall acceptability	7.19 ± 1.32	7.90 ± 0.99	0.055
Aftertaste/ mouthfeel	7.48 ± 1.47	7.67 ± 1.19	0.64

\*Significant differences ( $p < 0.05$ ) are marked with an asterisk.

acceptability). In every instance, a  $p$ -value of  $< 0.05$  was regarded as significant (Table 3).

The control sample of traditional *rawa sheera* with sugar scored significantly better than the experimental sample with agave syrup in terms of smell and overall acceptability with  $p$ -values of 0.03 and 0.01, respectively.

The experimental sample of *seviyan kheer* with agave syrup demonstrated statistically significant higher ratings for taste and flavor (Table 4).

The comparative evaluation of *seviyan kheer* and *rawa sheera* with agave syrup showed that the *seviyan kheer* received significantly higher scores for almost all sensory attributes (Table 5).

Reliability analysis is important for product development studies. It determines the association between the scores obtained from different administrations of the scale. If the association in reliability analysis is high,

Table 3. Mean score for sensory attributes for *rawa sheera*: control vs. agave syrup sample

Таблица 3. Средний балл по результатам органолептической оценки десерта «рава шира»: экспериментальный образец с сиропом агавы и контрольный образец с сахаром

Characteristics	Mean ± SD		p-value
	Control	Agave syrup	
Appearance	7.54 ± 1.07	7.05 ± 0.80	0.08
Color	7.19 ± 1.07	7.24 ± 0.94	0.88
Taste	7.48 ± 1.56	6.81 ± 1.16	0.15
Flavor	7.52 ± 1.12	6.81 ± 1.16	0.50
Smell	7.67 ± 0.96	6.95 ± 1.11	0.03*
Overall acceptability	7.67 ± 1.11	6.76 ± 1.26	0.01*
Aftertaste/ mouthfeel	7.24 ± 1.17	6.81 ± 1.40	0.29

\*Significant differences ( $p < 0.05$ ) are marked with an asterisk.

Table 5. Table 5. Mean score for sensory attributes for *rawa sheera* and *seviyan kheer* with agave syrup

Таблица 5. Средний балл по результатам органолептической оценки экспериментальных образцов десертов «рава шира» и «кхир севяян» с сиропом агавы

Characteristics	Mean ± SD		p-value
	<i>Rawa sheera</i> (agave syrup)	<i>Seviyan kheer</i> (agave syrup)	
Appearance	7.05 ± 0.80	8.05 ± 0.86	0.00*
Color	7.24 ± 0.94	7.90 ± 0.94	0.02*
Taste	6.81 ± 1.16	7.90 ± 0.99	0.002*
Flavor	6.81 ± 1.16	7.76 ± 0.88	0.005*
Smell	6.95 ± 1.11	7.43 ± 1.24	0.2
Overall acceptability	6.76 ± 1.26	7.90 ± 0.99	0.002*
Aftertaste/ mouthfeel	6.81 ± 1.40	7.67 ± 1.19	0.03*

\*Significant differences ( $p < 0.05$ ) are marked with an asterisk.

it is evident that the scale yields consistent results and is therefore reliable. Our research involved a reliability test, which demonstrated a high-reliability score of 92.5% (Cronbach's alpha = 0.925) for both the products developed.

**Paired comparison test. Expert panel.** Experimental *rawa sheera* and *seviyan kheer* with agave syrup were served with their sucrose- based control variants. In the blind test performed by the expert panel, *rawa sheera* with agave showed 40% relativity in color and aftertaste, 3% in flavor, taste, and consistency, and 10% in texture. The test with *seviyan kheer* showed admirable results with 90% relativity in flavor, 80% in taste, consistency, and texture, and 70% in color and aftertaste / mouthfeel (Fig. 5).

**Semi-expert panel.** The same blind testing procedure was repeated with semi-trained experts. *Rawa sheera*

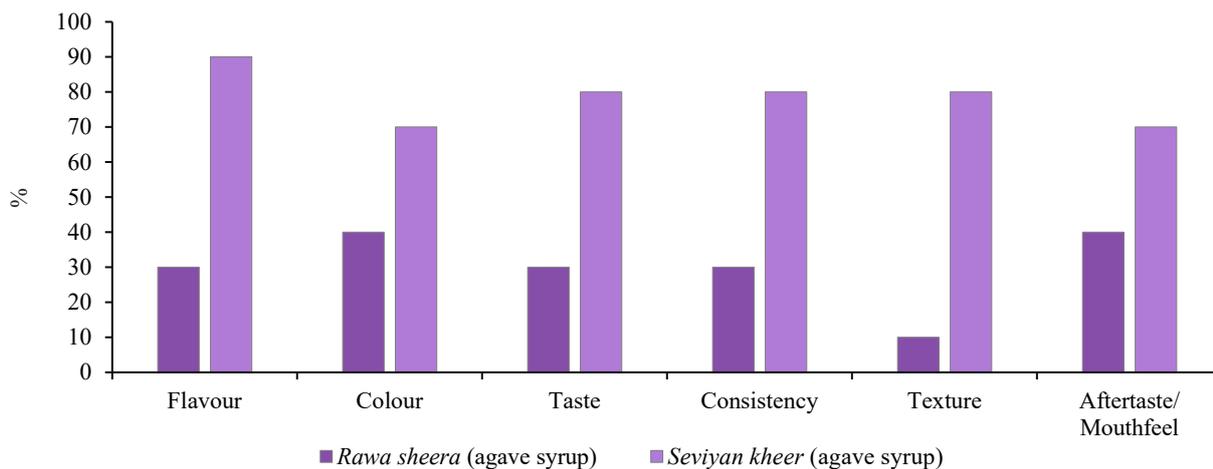


Figure 5. Paired comparison test by expert panel: *rawa sheera* and *seviyan kheer* with agave syrup vs. control samples with sugar

Рисунок 5. Результаты парного сравнительного анализа в группе экспертов: десерты «рава шира» и «кхир севян» с сиропом агавы и контрольные образцы с сахаром

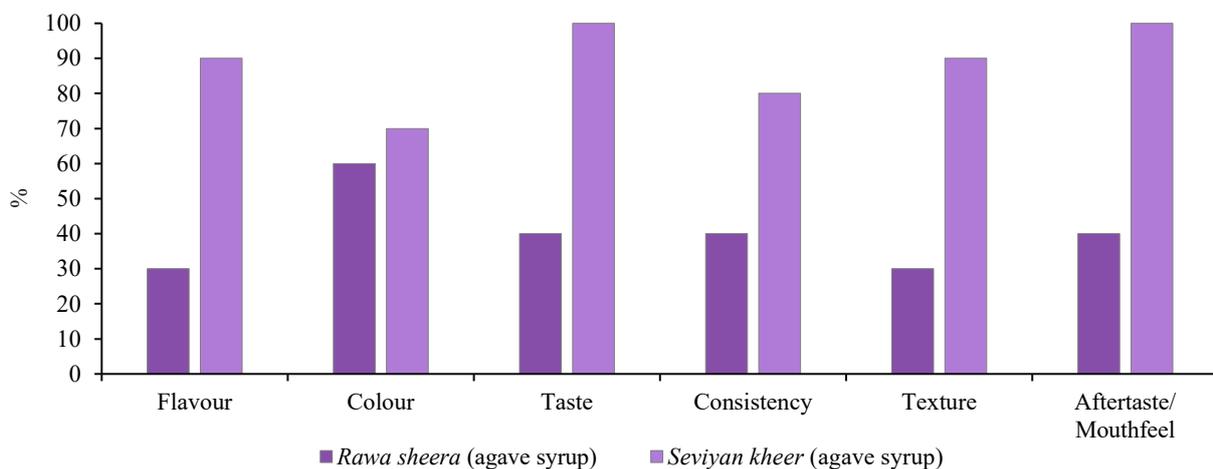


Figure 6. Paired comparison test by semi-expert panel: *rawa sheera* and *seviyan kheer* with agave syrup vs. control samples with sugar

Рисунок 6. Результаты парного сравнительного анализа в группе полуэкспертов: десерты «рава шира» и «кхир севян» с сиропом агавы и контрольные образцы с сахаром

with agave showed 60% relativity in color, 40% in taste, consistency, and aftertaste/mouthfeel, and 30% in flavor and texture. *Seviyan kheer* with agave again showed exceptional results with 100% relativity in taste and aftertaste/mouthfeel, 90% in flavor and texture, 80% in consistency, and 70% in color (Fig. 6).

**Acceptability analysis.** To study and analyze the consumer acceptability of standardized formulations, the products were developed in bulk and tested among a few of the subgroup study population (n = 85). It involved four preparations: two items were sugar-free (agave syrup) and two were with sugar. Participants rated the sweets for color, sweetness, texture, aftertaste, and overall acceptability. Figures 7–11 illustrate the comparison graphs for the four preparations.

The hedonic rating scale demonstrated no significant differences between the four preparations in color, sweetness, texture, aftertaste, and overall acceptability. Therefore, the sugar-free version of traditional Indian desserts *rawa sheera* and *seviyan kheer* were equally acceptable among the participants.

**Discussion.** Sucrose, being a key component of sweets and bakery goods, boosts their energy content. Because of chemical processes fueled by heat and involving degraded sugar, sucrose also contributes to the change in other sensory characteristics. Sweeteners meant to replace sucrose must be water-soluble, affordable, and tasty, as well as follow national or international standards [49]. Sugar is used in thousands of foods, ranging from cured meats to preserves, frozen fruits, and confections. In terms

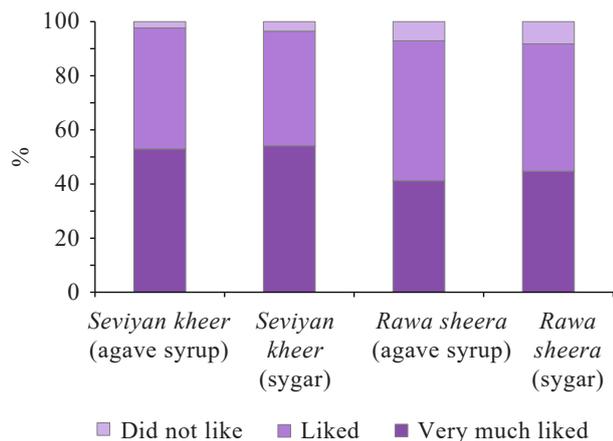


Figure 7. Color across four preparations

Рисунок 7. Результаты органолептической оценки: цвет

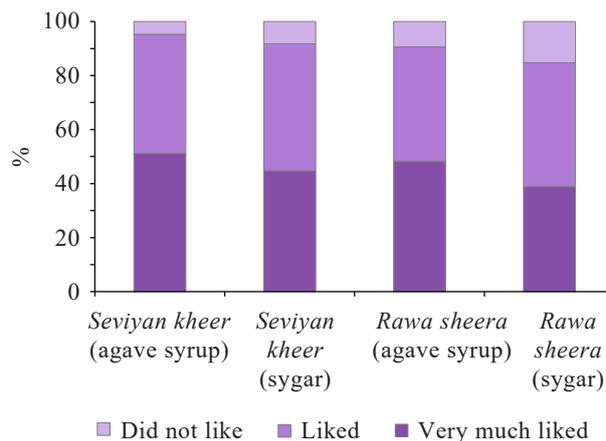


Figure 8. Sweetness across four preparations

Рисунок 8. Результаты органолептической оценки: сладость

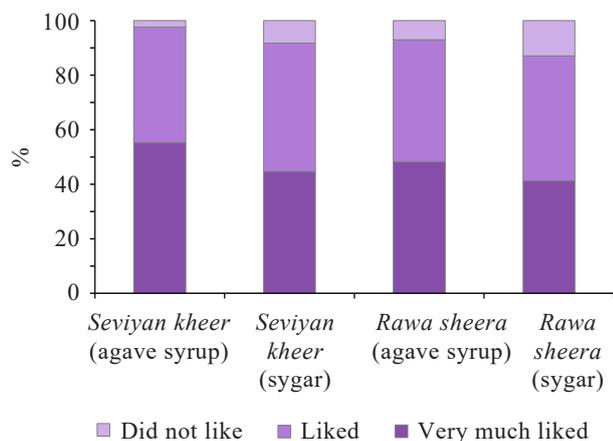


Figure 9. Texture across four preparations

Рисунок 9. Результаты органолептической оценки: консистенция

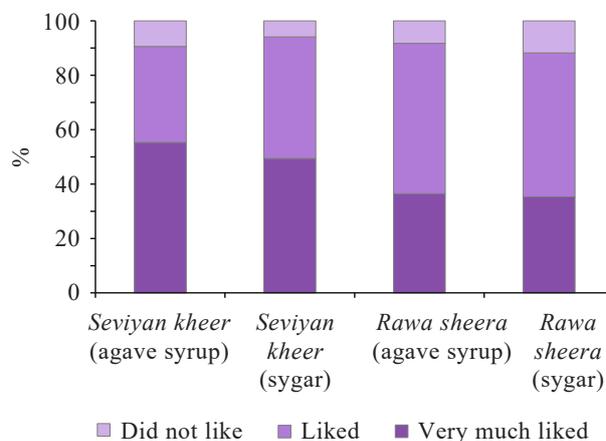


Figure 10. Aftertaste across four preparations

Рисунок 10. Результаты органолептической оценки: послевкусие

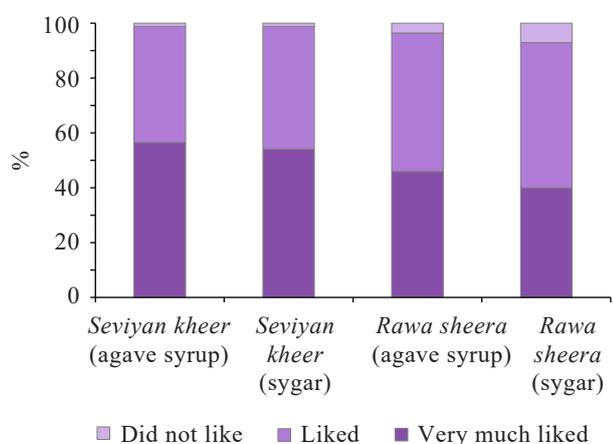


Figure 11. Overall acceptability across four preparations

Рисунок 11. Результаты органолептической оценки: общая привлекательность

of nutrition, sugar gives energy. In terms of calories, sugar is arguably the most economical food [50]. Too much added sugar intake is linked to a number of detrimental health effects. Popular indulgences, e.g., cakes and biscuits, add a substantial amount of extra sugar to people's diets. Food reformulation may make it possible to lower the amount of sugar in the diet without having to change one's eating habits [51]. The food industry has long faced the challenge of reducing the amount of sugar and energy (calories) in the diet. This challenge arises from both individual efforts to limit sugar and caloric intake, and public health policy initiatives, e.g., government reformulation programs and sugar taxes. Food producers and formulators have found it more challenging to meet this demand in recent years as consumers are looking for products with natural, clean-label ingredients. While high-potency does offer some benefits, zero-calorie sweeteners with better taste performance often present bigger

issue as they replace the bulking, browning, and other qualities that sucrose, glucose, and fructose provide to many solid food products [52].

Agave syrup in sweets and bakery goods, despite concerns about high calorie content and potential health risks, attract a lot of scientific attention. Investigations focus on its technological and functional properties as a sucrose substitute. Ozuna *et al.* reduced the sucrose content in muffins by up to 75% by adding agave syrup without affecting the original quality [29]. Mata-Ramirez *et al.* developed white bread with 9% roselle flour, enhancing dietary fiber, phenolic compounds, anthocyanins, and antioxidant capacity [53]. Zamora-Gasga *et al.* developed a granola bar using agave-based ingredients and agave syrup as a sweetener, thus reducing initial sucrose content without affecting sensory qualities [31]. Čižauskaitė *et al.* demonstrated the potential of gelatin and agave syrup in functional jellies, which can be fortified with active components [54]. Belščak-Cvitanović *et al.* reported that replacing sucrose with Agave syrup in low-sugar chocolates improved sensory quality and did not affect the bioactive chemical concentration but made the product harder [55].

Modified fructans generally demonstrated better functional qualities when compared to native fructans, offering a significant chance to enhance the functionality of the food that integrate them [56]. Additional clinical and *in vivo* investigations are necessary to clarify the effects of agave syrup on human health and relate these effects to the levels of fructose, fructans, and other bioactive components in the agave syrup. More research must be done to clarify the biological attributes of agave syrup against those of the commercially available conventional sweeteners [57].

### Conclusion

This study explored the possibility of replacing sugar in traditional Indian sweet treats with agave syrup. It featured such popular Indian desserts as *rawa sheera* and *seviyan kheer*. The sensory evaluation of these reformulated desserts involved a nine-point hedonic scale and a paired comparison test given to panels of experts and semi-experts. Both panels responded extremely well to the *seviyan kheer* with agave syrup. The reaction to the modified *rawa sheera*, while apparent, revealed a more subdued approval and less intense fervor than for *seviyan kheer*. The consumer acceptability analysis rendered *rawa sheera* and *seviyan kheer* equally acceptable.

Agave syrup proved to be an effective sucrose replacement for some traditional Indian desserts. However, the inherent limitation of the research was that it focu-

sed on these two desserts as a small portion of the wide range of traditional Indian sweets. Future studies are needed to cover a wide variety of Indian desserts, each distinguished by its unique combination of ingredients and complex cooking techniques, in order to evaluate the versatility and acceptability of agave syrup for other applications.

A thorough assessment is essential to go beyond sensory analysis. It has to take into account such practical aspects as economic viability of agave syrup and a comprehensive analysis of its nutritional makeup. Future studies should focus on these complex aspects in order to understand the viability, difficulties, and possible outcomes of including agave syrup as a substitute sweetener throughout the diverse range of customary Indian desserts.

### Contribution

All authors have contributed equally to the study and are equally responsible for the information published in this article.

### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

### Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Prof. Atul Gokhale, Director, Symbiosis School of Culinary Arts and Nutritional Sciences, for the venue and logistics support and Ms. Aditi Deshmane for the statistical support. They also acknowledge all the participants and culinary volunteers who took part in this study.

### Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов в отношении исследования, авторства и/или публикации данной статьи.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору Атулу Гокхале из Школы кулинарного искусства «Симбиоз» за организацию проведения и логистическую поддержку, а также госпоже Адити Дешмане за статистическую поддержку. Авторы выражают признательность всем участникам и кулинарным волонтерам, принявшим участие в этом исследовании.

### References

1. Throsby K. Pure, white and deadly: sugar addiction and the cultivation of urgency. *Food, Culture and Society*. 2020; 23(1):11–29. <https://doi.org/10.1080/15528014.2019.1679547>

2. Freeman CR, Zehra A, Ramirez V, Wiers CE, Volkow ND, Wang G-J. Impact of sugar on the body brain and behavior. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2018;23(12):2255–2266. <https://doi.org/10.2741/4704>
3. Yosry A, Elarieby M, Elsharif A. Sweet poison (sugar) [Internet]. [cited 2023 Nov 26]. Available from: <http://repository.limu.edu.ly/handle/123456789/1335>
4. Gaur MP. Sucrose - sweet poison for masses. *International Journal of Economic Perspectives*. 2020;14(1):156–160. <https://ijeponline.org/index.php/journal/article/view/162>
5. Sweet poison: How excess sugar is bad for you [Internet]. [cited 2023 Nov 26]. Available from: <https://starmed.care/sweet-poison-how-excess-sugar-is-bad-for-you/>
6. Studdert DM, Flanders J, Mello MM. Searching for public health law’s sweet spot: The regulation of sugar-sweetened beverages. *PLoS Medicine*. 2015;12(7):e1001848. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001848>
7. Epstein LH, Gordy CC, Raynor HA, Beddome M, Kilanowski CK, Paluch R. Increasing fruit and vegetable intake and decreasing fat and sugar intake in families at risk for childhood obesity. *Obesity Research*. 2001;9(3):171–178. <https://doi.org/10.1038/oby.2001.18>
8. Modan M, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eshkol A, Shefi M, *et al.* Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. *Journal of Clinical Investigation*. 1985;75(3):809–817. <https://doi.org/10.1172/jci111776>
9. Witek K, Wydra K, Filip M. A high-sugar diet consumption, metabolism and health impacts with a focus on the development of substance use disorder: A narrative review. *Nutrients*. 2022;14(14):2940. <https://doi.org/10.3390/nu14142940>
10. Hill JO, Prentice AM. Sugar and body weight regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1995;62(1):264S–274S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.1.264s>
11. Temple NJ. Fat, sugar, whole grains and heart disease: 50 years of confusion. *Nutrients*. 2018;10(1):39. <https://doi.org/10.3390/nu10010039>
12. The sweet danger of sugar [Internet]. Harvard Health. 2022 [cited 2023 Nov 26]. Available from: <https://www.health.harvard.edu/heart-health/the-sweet-danger-of-sugar>
13. Eating too much added sugar increases the risk of dying with heart disease [Internet]. Harvard Health. 2014 [cited 2023 Nov 26]. Available from: <https://www.health.harvard.edu/blog/eating-too-much-added-sugar-increases-the-risk-of-dying-with-heart-disease-201402067021>
14. Lean MEJ, Te Morenga L. Sugar and type 2 diabetes. *British Medical Bulletin*. 2016;120(1):43–53. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldw037>
15. Miller AW, Orr T, Dearing D, Monga M. Loss of function dysbiosis associated with antibiotics and high fat, high sugar diet. *The ISME Journal*. 2019;13(6):1379–1390. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0357-4>
16. Andreas E, Reid M, Zhang W, Moley KH. The effect of maternal high-fat/high-sugar diet on offspring oocytes and early embryo development. *Molecular Human Reproduction*. 2019;25(11):717–728. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz049>
17. Heinonline. [Internet]. org. [cited 2023 Nov 26]. Available from: [https://heinonline.org/hol-cgibin/get\\_pdf.cgi?handle=hein.journals/injlolw11&section=681](https://heinonline.org/hol-cgibin/get_pdf.cgi?handle=hein.journals/injlolw11&section=681)
18. Xu Y, Wu Y, Liu Y, Li J, Du G, Chen J, *et al.* Sustainable bioproduction of natural sugar substitutes: Strategies and challenges. *Trends in Food Science and Technology*. 2022;129:512–527. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.008>
19. Saraiva A, Carrascosa C, Ramos F, Raheem D, Raposo A. Agave syrup: chemical analysis and nutritional profile, applications in the food industry and health impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022;19(12):7022. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127022>
20. Álvarez-Chávez J, Villamiel M, Santos-Zea L, Ramírez-Jiménez AK. Agave by-products: An overview of their nutraceutical value, current applications, and processing methods. *Polysaccharides*. 2021;2(3):720–743. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030044>
21. Espinosa-Andrews H, Urías-Silvas JE, Morales-Hernández N. The role of agave fructans in health and food applications: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2021;114:585–598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.022>
22. Yargatti R, Muley A. Agave syrup as a replacement for sucrose: An exploratory review. *Functional Foods in Health and Disease*. 2022;12(10):590–600. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v12i10.1003>
23. Ozuna C, Franco-Robles E. Agave syrup: An alternative to conventional sweeteners? A review of its current technological applications and health effects. *LWT*. 2022;162:113434. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113434>
24. Rodríguez-Rodríguez R, Barajas-Álvarez P, Morales-Hernández N, Camacho-Ruiz RM, Espinosa-Andrews H. Physical properties and prebiotic activities (*Lactobacillus* spp.) of gelatine-based gels formulated with agave fructans and agave syrups as sucrose and glucose substitutes. *Molecules*. 2022;27(15):4902. <https://doi.org/10.3390/molecules27154902>
25. Cardona-Herrera R, Franco-Robles E, Quiñones-Muñoz TA, Ozuna C. The hydrolysis degree of agave syrup modulates its functional properties: Impact on metabolic responses and oxidative stress in C57BL/6 mice. *Food Bioscience*. 2023;53:102775. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102775>
26. Brown R. Sugar free and reduced sugar chocolate and methods of manufacture. US Patent 20080248183A1. October 2008.

27. Strode I, Galoburda R. Rheological Properties of Chocolate Depending on the Added Sweetener. In: Proceedings of the 11th International Scientific Conference “Student on Their Way to Science” Collection of Abstracts. Jelgava, Latvia; 2016. p. 54.
28. Dhillon-Gill RK. Nutritional supplement. US Patent 20100029581A1. February 2010.
29. Ozuna C, Trueba-Vázquez E, Moraga G, Llorca E, Hernando I. Agave Syrup as an Alternative to Sucrose in Muffins: Impacts on Rheological, Microstructural, Physical, and Sensorial Properties. *Foods*. 2020;9(7):895. <https://doi.org/10.3390/foods9070895>
30. Santiago-García PA, Mellado-Mojica E, León-Martínez FM, Dzul-Cauich JG, López MG, García-Vieyra MI. Fructans (agavins) from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum* as fat replacement in yogurt: Effects on physicochemical, rheological, and sensory properties. *LWT*. 2021;140:110846. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110846>
31. Zamora-Gasga VM, Bello-Pérez LA, Ortíz-Basurto RI, Tovar J, Sáyago-Ayerdi SG. Granola bars prepared with *Agave tequilana* ingredients: Chemical composition and *in vitro* starch hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;56(2):309–314. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.016>
32. Saveski A, Stamatovska V, Pavlova V, Kalevska T, Spirovska Vaskoska R. Sensory analysis of raspberry jam with different sweeteners. *Food Science, Engineering and Technologies*. 2015;294–297. <https://eprints.uklo.edu.mk/id/eprint/1687/>
33. Song CR, Kim ES, Kim HA, Kim YS, Choi SK. Quality Characteristics of *Teriyaki* sauce Added with Different Sweeteners. *Culinary Science and Hospitality Research*. 2012;18(2):197–205. <https://koreascience.kr/article/JAKO201218553923376.pdf>
34. Jardines AP, Arjona-Román JL, Severiano-Pérez P, Totosaus-Sánchez A, Fiszman S, Escalona-Buendía HB. Agave fructans as fat and sugar replacers in ice cream: Sensory, thermal and texture properties. *Food Hydrocolloids*. 2020;108:106032. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106032>
35. Jimenez-Sánchez DE, Calderón-Santoyo M, Ortiz-Basurto RI, Bautista-Rosales PU, Ragazzo-Sánchez JA. Effect of maltodextrin reduction and native agave fructans addition on the physicochemical properties of spray-dried mango and pineapple juices. *Food Science and Technology International*. 2018;24(6):519–532. <https://doi.org/10.1177/1082013218769168>
36. Mayer M. US Patent 12/651,939. 2010.
37. Sobaszek P, Różyło R, Dziki L, Gawlik-Dziki U, Biernacka B, Panasiewicz M. Evaluation of Color, Texture, Sensory and Antioxidant Properties of Gels Composed of Freeze-Dried Maqui Berries and Agave Sugar. *Processes*. 2020;8(10):1294. <https://doi.org/10.3390/pr8101294>
38. Escobedo-García S, Salas-Tovar JA, Flores-Gallegos AC, Contreras-Esquivel JC, González-Montemayor ÁM, López MG, et al. Functionality of agave bagasse as supplement for the development of prebiotics-enriched foods. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2020;75:96–102. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00785-z>
39. Mohan V, Sandeep S, Deepa R, Shah B, Varghese C. Epidemiology of type 2 diabetes: Indian scenario. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;125(3):217–230. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17496352/>
40. Yargatti R, Muley A. Sensory characteristics of selective traditional Indian sweets using agave syrup and stevia: An observatory study. *Functional Foods in Health and Disease*. 2022;12(12):748–758. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v12i12.1042>
41. Gulati S, Misra A. Sugar intake, obesity, and diabetes in India. *Nutrients*. 2014;6(12):5955–5974. <https://doi.org/10.3390/nu6125955>
42. Srikanth P, Ram MR. Economic Impact of Festivals: Evidence from Diwali effect on Indian stock market. *International Refereed Research Journal*. 2013;2(1):27–37.
43. Jain S, Wadhwa R. Study of Changing Pattern of Preference and Purchase Decision at the Time of Festivals:(Empirical Study of Purchase Decision of Edible Gift Items). 4th National Conference on Recent Trends in Humanities, Technology, Management and Social Development. 2019;9:513–518. [https://www.indusedu.org/pdfs/IJREISS/IJREISS\\_3006\\_27959.pdf](https://www.indusedu.org/pdfs/IJREISS/IJREISS_3006_27959.pdf)
44. Maity TK, Kumar R, Misra AK. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from *Chhana* based Indian sweets in relation to public health. *Indian Journal of Microbiology*. 2010;50:463–467. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0102-9>
45. Chawla D, Sondhi N. Attitude and consumption patterns of the Indian chocolate consumer: An exploratory study. *Global Business Review*. 2016;17(6):1412–1426. <https://doi.org/10.1177/0972150916660408>
46. Dixit S, Khanna SK, Das M. All India survey for analyses of colors in sweets and savories: Exposure risk in Indian population. *Journal of Food Science*. 2013;78(4):T642–T647. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12068>
47. da Silva AN, Silva R de C dos SN d, Ferreira MAM, Minim VPR, Costa T de MT da, Perez R. Performance of hedonic scales in sensory acceptability of strawberry yogurt. *Food Quality and Preference*. 2013;30(1):9–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.04.001>
48. Yang Q, Ng ML. Paired comparison/directional difference test/2-alternative forced choice (2- AFC) test, simple difference test/same-different test. In: Rogers L, editor. *Discrimination Testing in Sensory Science*. Woodhead Publishing; 2017. pp. 109–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101009-9.00005-8>
49. Struck S, Jaros D, Brennan CS, Rohm H. Sugar replacement in sweetened bakery goods. *International Journal of Food Science and Technology*. 2014;49(9):1963–1976. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12617>

50. Cotton RH, Rebers PA, Maudru JE, Rorabaugh G. The role of sugar in the food industry. In: Cantor SM, editor. Use of Sugars and Other Carbohydrates in the Food Industry. American Chemical Society; 1955. pp. 3–20. <https://doi.org/10.1021/ba-1955-0012.ch001>
51. Luo X, Arcot J, Gill T, Louie JC, Rangan A. A review of food reformulation of baked products to reduce added sugar intake. *Trends in Food Science and Technology*. 2019;86:412–425. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.051>
52. Erickson S, Carr J. The technological challenges of reducing the sugar content of foods. *Nutrition Bulletin*. 2020; 45(3):309–314 <https://doi.org/10.1111/nbu.12454>
53. Mata-Ramírez D, Serna-Saldívar SO, Vilella-Castrejón J, Villaseñor-Durán MC, Buitimea-Cantúa NE. Phytochemical profiles, dietary fiber and baking performance of wheat bread formulations supplemented with Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2018;2:2657–2665. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9883-4>
54. Čižauskaitė U, Jakubaitytė G, Žitkevičius V, Kasparavičienė G. Natural ingredients-based gummy bear composition designed according to texture analysis and sensory evaluation in vivo. *Molecules*. 2019;24(7):1442. <https://doi.org/10.3390/molecules24071442>
55. Belščak-Cvitanović A, Komes D, Dujmović M, Karlović S, Biškić M, Brnčić M, *et al.* Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. *Food Chemistry*. 2015;167:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.064>
56. Ignat-Gutiérrez A, Ortiz-Basurto RI, García-Barradas O, Díaz-Ramos DI, Jiménez-Fernández M. Physicochemical and functional properties of native and modified agave fructans by acylation. *Carbohydrate Polymers*. 2020;245:116529. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116529>
57. Ozuna C, Franco-Robles E. Agave syrup: An alternative to conventional sweeteners? A review of its current technological applications and health effects. *LWT*. 2022;162:113434. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.1134>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2548>  
<https://elibrary.ru/ZBMYDW>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Применение эндофитных микроорганизмов для интенсификации ростовых процессов сельскохозяйственных культур



Е. Р. Фасхутдинова\*<sup>ORCID</sup>, Н. Н. Богачёва<sup>ORCID</sup>, Е. Е. Бородина<sup>ORCID</sup>,  
А. В. Позднякова<sup>ORCID</sup>, С. А. Лузянин<sup>ORCID</sup>

Кемеровский государственный университет<sup>ORCID</sup>, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 15.04.2024  
Принята после рецензирования: 08.05.2024  
Принята к публикации: 04.06.2024

\*Е. Р. Фасхутдинова: [fashutdinova.liz@yandex.ru](mailto:fashutdinova.liz@yandex.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-9711-2145>  
Н. Н. Богачёва: <https://orcid.org/0000-0002-4238-5370>  
Е. Е. Бородина: <https://orcid.org/0000-0001-6362-7589>  
А. В. Позднякова: <https://orcid.org/0000-0002-6854-0850>  
С. А. Лузянин: <https://orcid.org/0000-0001-9293-4377>

© Е. Р. Фасхутдинова, Н. Н. Богачёва, Е. Е. Бородина,  
А. В. Позднякова, С. А. Лузянин, 2024



### Аннотация.

Повышение продуктивности основных сельскохозяйственных культур (пшеницы, ячменя и овса) является актуальной проблемой. Урожайность данных культур во многом зависит от плодородия почвы. Недостаток биогенных веществ в почвах восполняют минеральными удобрениями, которые при неправильном применении неэкологичны и малоэффективны. Обеспечить растения необходимыми питательными элементами способны микроорганизмы. Цель данной работы – выделение эндофитных микроорганизмов, обладающих ростостимулирующими свойствами, а также оценка их влияния на рост пшеницы, ячменя и овса.

Объектами исследования являлись яровая мягкая пшеница сорта «Сибирский Альянс», яровой овес сорта «Марушак», яровой ячмень сорта «Никита» и стандартные штаммы бактерий (*Azospirillum brasilense* В-11094 и *Azotobacter chroococcum* В-8739). Выделенные бактерии идентифицировали с помощью автоматического микробиологического анализатора Vitex 2 Compact. Способность изолятов микроорганизмов продуцировать индолил-3-уксусную и гиббереллиновую кислоты оценивали спектрофотометрическими методами. Способность к фиксации азота штаммами определяли с помощью Rapid N Cube. Способность изолятов солибилизировать фосфаты тестировали на среде, содержащей кальций фосфорнокислый. Влияние наиболее перспективных штаммов на сельскохозяйственные культуры оценивали в лабораторных условиях.

Выделено и идентифицировано 7 изолятов эндофитных микроорганизмов, таких как *Pantoea allii* Tri, *Bacillus subtilis* Tri 2, *Bacillus subtilis* Ave 1, *Pantoea allii* Ave 2, *Bacillus subtilis* Hor 1, *Bacillus subtilis* Hor 2, *Bacillus subtilis* Hor 3. Изучены ростостимулирующие свойства штаммов и отобраны наиболее перспективные. Штамм *Bacillus subtilis* Ave 1 продуцировал 7100 мкг/мл индолил-3-уксусной и 343 мкг/мл гиббереллиновой кислот, фиксировал 790 мкг/мл азота, солибилизировал фосфаты (индекс 1,60). *Bacillus subtilis* Hor 1 демонстрировал способность к синтезу 4490 мкг/мл индолил-3-уксусной и 409 мкг/мл гиббереллиновой кислот, фиксировал азот в количестве 760 мкг/мл, а также солибилизировал фосфаты (индекс 1,44). Лабораторная апробация штаммов показала, что наибольшей ростостимулирующей активностью обладает штамм *Bacillus subtilis* Ave 1.

Выделенный в ходе работы штамм обладает способностью к синтезу фитогормонов, фиксирует атмосферный азот и солибилизировать фосфаты. Лабораторная апробация показала, что штамм увеличивает длину побега и корня пшеницы и ячменя, а также повышает всхожесть, энергию прорастания и длину побега у овса. Это обуславливает высокие перспективы применения выделенного штамма в сельском хозяйстве.

**Ключевые слова.** Овес, пшеница, ячмень, эндофитные микроорганизмы, *Bacillus*, *Pantoea*, *Azotobacter*, *Azospirillum*

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Исследование потенциала ростостимулирующих бактерий для повышения агрономической биофортификации пшеницы» (шифр FZSR-2024-0009).

**Для цитирования:** Применение эндофитных микроорганизмов для интенсификации ростовых процессов сельскохозяйственных культур / Е. Р. Фасхутдинова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 820–836. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2548>

## Effect of Endophytic Microorganisms on Growth Rate of Crops

Elizaveta R. Faskhutdinova\*<sup>ID</sup>, Natalia N. Bogacheva<sup>ID</sup>,  
Ekaterina E. Borodina<sup>ID</sup>, Anna V. Pozdnyakova<sup>ID</sup>,  
Sergey L. Luzyanin<sup>ID</sup>

Kemerovo State University<sup>ROR</sup>, Kemerovo, Russia

Received: 15.04.2024  
Revised: 08.05.2024  
Accepted: 04.06.2024

\*Elizaveta R. Faskhutdinova: [faskhutdinova.liz@yandex.ru](mailto:faskhutdinova.liz@yandex.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-9711-2145>  
Natalia N. Bogacheva: <https://orcid.org/0000-0002-4238-5370>  
Ekaterina E. Borodina: <https://orcid.org/0000-0001-6362-7589>  
Anna B. Pozdnyakova: <https://orcid.org/0000-0002-6854-0850>  
Sergey L. Luzyanin: <https://orcid.org/0000-0001-9293-437>

© E.R. Faskhutdinova, N.N. Bogacheva, E.E. Borodina, A.B. Pozdnyakova,  
S.L. Luzyanin, 2024



### Abstract.

Increasing the yield of wheat, barley, and oats is a pressing issue. It largely depends on soil fertility. Mineral fertilizers, however, may be ineffective and unsustainable. As a result, microorganisms seem to be a promising alternative. The authors isolated endophytic microorganisms with growth-stimulating properties and assessed their effect on the growth rate of wheat, barley, and oats in laboratory conditions.

The research involved spring soft wheat of the Sibirsky Alyans variety, spring oats of the Maruchak variety, spring barley of the Nikita variety, and standard bacterial strains (*Azospirillum brasilense* B-11094, *Azotobacter chroococcum* B-8739). The isolated bacteria were identified using a Vitex 2 Compact automatic microbiological analyzer. The production potential for indole-3-acetic and gibberellic acids was assessed spectrophotometrically. The nitrogen fixation potential was determined using a Rapid N Cube. The phosphate-solubilizing potential was tested on a calcium phosphate medium. The effect of the most promising strains on the growth rate was assessed in laboratory conditions.

Seven isolates of endophytic microorganisms were identified as *Pantoea allii* Tri, *Bacillus subtilis* Tri 2, *Bacillus subtilis* Ave 1, *Pantoea allii* Ave 2, *Bacillus subtilis* Hor 1, *Bacillus subtilis* Hor 2, and *Bacillus subtilis* Hor 3. The most promising growth promoters ranged as follows. *Bacillus subtilis* Ave 1 fixed 790 µg/mL nitrogen, solubilized phosphates with index 1.60, and produced 7100 µg/mL indolyl-3-acetic acid and 343 µg/mL gibberellic acid. *Bacillus subtilis* Hor 1 fixed 760 µg/mL nitrogen, solubilized phosphates with index 1.44, and synthesized 4490 µg/mL indolyl-3-acetic acid and 409 µg/mL gibberellic acid. *Bacillus subtilis* Ave 1 demonstrated the greatest growth-stimulating activity.

*Bacillus subtilis* Ave 1 could synthesize phytohormones, fix atmospheric nitrogen, and solubilize phosphates, which indicated good agricultural prospects. The strain increased the length of shoots and roots in wheat and barley, as well as boosted germination and shoot length in oats.

**Keywords.** Oats, wheat, barley, endophytic microorganisms, *Bacillus*, *Pantoea*, *Azotobacter*, *Azospirillum*

**Funding.** The research was part of State Assignment FZSR-2024-0009: Potential growth-stimulating bacteria in agronomic biofortification of wheat.

**For citation:** Faskhutdinova ER, Bogacheva NN, Borodina EE, Pozdnyakova AV, Luzyanin SL. Effect of Endophytic Microorganisms on Growth Rate of Crops. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):820–836. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2548>

### Введение

Сельское хозяйство является сложной и трудоемкой отраслью, решающее значение в которой отводится производству зерна [1]. К основным злаковым культурам, возделываемым во всем мире, относят пшеницу (*Triticum aestivum* L.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и

овес (*Avena sativa* L.) [2, 3]. Пшеница является одной из первых одомашненных злаковых культур, традиционно используемой в качестве основного источника питания в регионах с ограниченными возможностями для выращивания других злаковых культур. Ячмень обыкновенный – четвертая по объему производства

злаковая культура после кукурузы, риса и пшеницы [4]. В настоящее время овес является ключевым компонентом в рационе многих людей [5]. Это второстепенная, универсальная цельнозерновая культура, используемая в пищу, кормах для животных и непищевых продуктах [6]. Овес выращивается во всем мире и занимает седьмое место в мировой статистике производства злаковых культур [7].

В связи со стремительным ростом численности населения увеличивается спрос на продовольствие и сельскохозяйственную продукцию [8, 9]. Для борьбы с возможной угрозой нехватки продуктов питания и обеспечения продовольственной безопасности используются различные способы повышения урожайности и качества сельскохозяйственных культур.

Одним из основных факторов, влияющих на урожайность злаковых культур, является плодородие почв [10]. Наиболее распространенным методом современной сельскохозяйственной практики для повышения плодородия почв и урожайности культур является внесение удобрений – источников питательных веществ для растений. Азот, фосфор, калий, кальций, сера, магний, а также различные гормоны контролируют рост и развитие сельскохозяйственных культур и положительно влияют на их урожайность. Азот, фосфор и калий являются наиболее значимыми макроэлементами, которые необходимы сельскохозяйственным культурам в большом количестве.

Таким образом, перед учеными стоит задача разработать более безопасные и эффективные способы увеличения урожайности сельскохозяйственных культур за счет разработки новых видов удобрений. В связи с высокими требованиями к качеству сельскохозяйственной продукции возрастает роль биологизации сельского хозяйства [11]. Устойчивость системы сельского хозяйства может быть достигнута за счет разработки и использования биоудобрений.

Биоудобрения – продукты, содержащие один или несколько видов микроорганизмов, которые способны переводить важные питательные вещества из непригодной для усвоения формы в пригодную, тем самым поддерживая рост растений [8, 12]. Как правило, в качестве микроорганизмов используются штаммы, обладающие азотофиксирующей, фосфор- и калий-солюбилизующей активностью, а также способностью продуцировать фитогормоны [13]. Применение эндофитов (непатогенных микроорганизмов, обитающих во внутриклеточных тканях растений-хозяев) в качестве биоудобрений может быть лучшим подходом к улучшению микробного статуса почвы, тем самым влияя на доступность питательных веществ и разложение органического вещества [14]. Эндофиты способствуют росту растений-хозяев при помощи различных механизмов: повышение доступности и фиксации биогенных элементов (фиксация азота, солюбилизация фосфора, калия, цинка и др.); антагонистическое действие в отношении фитопатогенов (синтез циани-

дов, антибиотиков, литических ферментов, летучих соединений); синтез ростостимулирующих веществ (гиббереллиновой кислоты, индоллил-3-уксусной кислоты и др.) [15–18].

Так как азот является одним из важнейших питательных компонентов растений, особый интерес ученых вызывают азотофиксирующие микроорганизмы. Они подразделяются на симбиотические и несимбиотические [19]. К симбиотическим микроорганизмам относятся представители семейства *Rhizobiaceae*, которые образуют симбиотические отношения с бобовыми растениями. К несимбиотическим микроорганизмам относятся свободноживущие и эндофитные формы микроорганизмов, такие как *Cyanobacteria*, *Azospirillum*, *Azotobacter* и др.

*Azospirillum* – ризобактерия, стимулирующая рост и развитие растений (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR-бактерия), колонизируя поверхности корней и стеблей, а также внутренние ткани корня без образования специализированных структур [20]. Помимо этого, представители *Azospirillum* могут расщеплять сложные соединения, делая их доступными для роста растений [21]. Наиболее известны представители этого рода в качестве компонентов биоудобрений, успешно применяемых в сельском хозяйстве. Несмотря на то что наиболее распространенным преимуществом *Azospirillum* является ее способность фиксировать азот, все большее число исследований описывает другие свойства, которые подразумевают стимулирование роста растений. Одним из основных свойств *Azospirillum* является синтез фитогормонов и других соединений, включая ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовую кислоту, этилен и салициловую кислоту [22]. Некоторые штаммы *Azospirillum* могут растворять неорганический фосфор, делая его более доступным для растений и приводя к более высоким урожаям [23]. Имеются сообщения о том, что *Azospirillum* снижает негативное воздействие абиотического стресса, засухи и засоления на растения [24]. В работе R. Kizilkaya штаммы *Azotobacter chroococcum*, выделенные из ризосферы, оказывали положительное влияние на урожайность и концентрацию азота в *Triticum aestivum* [25]. С. Dal и соавторы изучили влияние бактериального консорциума (*Azospirillum* spp. + *Azoarcus* spp. + *Azorhizobium* spp.) и двух других грибово-бактериальных консорциумов (*Rhizophagus irregularis* + *Azotobacter vinelandii* и *R. rregularis* + *Bacillus megaterium* + *Frateuria aurantia*) на *Triticum aestivum* L. Установлено, что обработка семян консорциумами позволила значительно улучшить рост растений и накопление азота во время удлинения стеблей и колосения [26].

*Azotobacter* – свободноживущие, аэробные, фотоавтотрофные несимбиотические бактерии, принадлежащие к семейству *Azotobacteriaceae* [19]. Обычно они присутствуют в нейтральных и щелочных почвах. *A. chroococcum* является наиболее часто встречаю-

щимся видом на пахотных почвах. Другими зарегистрированными видами являются *A. vinelandii*, *Azotobacter beijerinckii*, *Azotobacter insignis* и *Azotobacter macrocytogenes* [27]. Представители данного рода могут фиксировать атмосферный азот, выделять растительные гормоны, солюбилизировать фосфаты и противодействовать патогенам растений [28]. Наиболее известными видами рода *Azotobacter* являются *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus* и др. В работе S. H. T. Harper и соавторов рассматривается влияние штамма *A. chroococcum* на *Hordeum vulgare* L. Показано, что фильтрат культуры *A. chroococcum* стимулирует удлинение корней проростков [29]. U. K. Bageshwar с соавторами инокулировали семена пшеницы штаммом *A. chroococcum* CBD15, который был получен из почвы. Результаты показали, что с присутствием микроорганизма происходит лучшая усвояемость азота, а также *A. chroococcum* CBD15 продуцирует индолил-3-уксусную кислоту [30].

В таблице 1 представлены образцы растений и микроорганизмов, выделенных из них, которые используют для создания биоудобрений.

Согласно литературным данным, злаковые культуры являются перспективным источником для получения бактериальных эндофитов, инокулянты которых предпочтительно использовать для создания биоудобрений. Использование микроорганизмов может снизить потребность в применении химических удобрений, повысить устойчивость и толерантность растений к стрессу и способствовать экологизации сельского хозяйства [46, 47].

Большинство эндофитов происходит из эпифитных сообществ, принадлежащих ризосфере, филлосфере или другим частям растений, но некоторые из них могут передаваться через семена [54]. Семенные эндофиты приспособлены к симбиотическому жизненному циклу внутри растений, вертикально передаваемому за счет конкурентоспособности и

Таблица 1. Бактериальные эндофиты, стимулирующие рост растений

Table 1. Growth-stimulating bacterial endophytes

Растение и зона выделения микроорганизмов	Микроорганизм	Свойство	Источники
<i>Triticum aestivum</i> L.	Корневая зона	<i>Azospirillum brasilense</i>	Фиксация азота [31]
	Ризосфера	<i>Azospirillum</i>	Синтез фитогормонов [32]
	Корневая зона	<i>Azospirillum brasilense</i> FP2	Синтез фитогормонов [33]
	Ризосфера	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Солюбилизация, синтез фитогормонов [34]
<i>Triticum aestivum</i> L.	Корневая зона	<i>Bacillus megaterium</i> ZE32, <i>Bacillus megaterium</i> ZR19, <i>Bacillus subtilis</i> ZE15, <i>Bacillus subtilis</i> ZR3	Солюбилизация фосфора [35, 36]
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Ризосфера и корневая зона	<i>Erwinia</i> sp. EU-B2SNL1	Фиксация азота [37]
		<i>Chryseobacterium arthrosphaerae</i> EU-LWNA-37	Солюбилизация фосфора
		<i>Pseudomonas gessardii</i> EU-MRK-19	Солюбилизация калия
<i>Triticum aestivum</i> L.	Корневая зона, стебель, лист и семечко	<i>Bacillus aryabhatai</i> , <i>B. stratosphericus</i> , <i>B. simplex</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , <i>Ewingella americana</i> , <i>Leclercia adecarboxylata</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Pan. anthophila</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Ps. kribbensis</i> , <i>Ps. oryzihabitans</i> , <i>Ps. putida</i> , <i>Ps. rhodesiae</i> и <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Солюбилизация, синтез фитогормонов [38]
<i>Saccharum officinarum</i> L.	Ризосфера и корневая зона	<i>Azospirillum amazonense</i>	Фиксация азота [39]
		<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	[40]
<i>Zea mays</i> L.	Корневая зона	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Фиксация азота [41]
<i>Oryza sativa</i> L., <i>Zea mays</i> L., <i>Triticum aestivum</i> L.	Корневая зона	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	Фиксация азота, синтез фитогормонов [42]
<i>Oryza sativa</i> L.	Ризосфера и корневая зона	<i>Azospirillum irakense</i>	Фиксация азота [43]
<i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heynh.	Ризосфера и корневая зона	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Синтез фитогормонов [44]
<i>Gossypium</i> L., <i>Triticum aestivum</i> L.	Ризосфера	<i>Azotobacter</i> spp.	Синтез фитогормонов [45]

способности выживать в большинстве сред за пределами растения. Этот тип передачи благоприятствует мутуализму против патогенности. Эндосимбиоз семян – это жизненно важная взаимосвязь, которая обеспечивает повышенную жизнеспособность, всхожесть и устойчивость семян и, таким образом, общее улучшение роста в стрессовых условиях [55]. Эндоситы семян могут обладать способностью усиливать всхожесть в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами [54]. Во время прорастания семена склонны к заражению почвенными патогенами. Эндоситные бактерии, переносимые семенами, действуют как компетентные агенты биоконтроля во время формирования проростков [56]. Механизмы индукции защиты, обеспечиваемой эндоситами растения-хозяина, зависят от свойств эндоситов, например индукции активных форм кислорода, синтеза антимикробных метаболитов, синтеза липопептидов, выработки растительных гормонов. Эндоситы семян относительно не изучены, но привлекают внимание ученых как перспективный источник биоудобрений.

Цель данной работы – выделение эндоситных микроорганизмов, обладающих способностью стимулировать и улучшать питание растений, из семян злаковых культур, а также оценка ростостимулирующих свойств изолятов.

#### Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали семена злаковых культур: яровая мягкая пшеница сорта «Сибирский Альянс» (рис. 1а), яровой овес сорта «Маручак» (рис. 1б), яровой ячмень сорта «Никита» (рис. 1с), предоставленные Кемеровским научно-исследовательским институтом сельского хозяйства – филиалом Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН, г. Кемерово.

Дизайн эксперимента приведен на рисунке 2 и состоял из трех этапов: выделение эндоситных бактерий из семян злаковых культур; анализ ростостимулирующих

свойств выделенных штаммов; лабораторная апробация перспективных штаммов.

Выделение эндоситных бактерий из семян злаковых культур осуществляли согласно методике R. Sa [48]. Семена злаковых культур стерилизовали 70 % этиловым спиртом (Кемеровская фармацевтическая фабрика, Россия) и 3 % раствором гипохлорита натрия (ХимКомпонент, Россия; процент активного хлора 2,86 %) с экспозицией по 3 мин. После каждого дезинфицирующего средства осуществляли 3-кратную промывку семян стерильной дистиллированной водой. Для приготовления суспензии 1 г измельченных, стерилизованных семян добавляли в 10 мл стерильной воды, выдерживали в шейкер-инкубаторе LSI-3016R (Daihan Labtech, Южная Корея) в течение 2 ч при температуре  $28 \pm 2$  °C, 110 об/мин.

Для выделения микроорганизмов, способных выживать на бедных почвах, 1 мл суспензии переносили на жидкую среду Difco M9 Minimal Salts, 5× (Le Pont de Claix, Франция). Культивировали при  $28 \pm 2$  °C, 110 об/мин в течение 72 ч на шейкер-инкубаторе.

В связи с вышесказанным важно выделить микроорганизмы, устойчивые к солевому стрессу. Для этого брали 5 % культуральной жидкости от объема питательной среды, выращенной на минимальной солевой среде, и культивировали на бульоне Луриа-Бертани в модификации Миллера (далее – бульон LB) (Фарма Групп, Россия) с добавлением 6 г/л хлорида натрия [49]. Культивировали при условиях, указанных выше.

Для выделения микроорганизмов, устойчивых к химическим препаратам, 5 % (от объема питательной среды) культуральной жидкости, полученной на предыдущем этапе, вносили в бульон LB с добавлением хизалофоп-П-этила (Лабтех, Россия), метсульфурон-метила (гербициды) (HPC Standards, Германия) по 3 мл/л и имидаклоприда (инсектицид) (Оптимум, Россия) по 3 г/л. Культивирование вели при условиях, указанных выше.

Чистые культуры получали методом глубинного посева 1 мл приготовленной суспензии на среде LB.

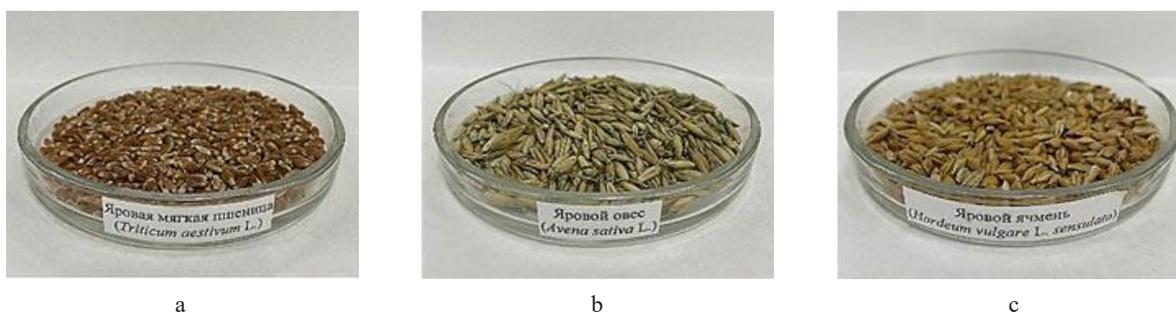


Рисунок 1. Объекты исследования: а – яровая мягкая пшеница сорта «Сибирский Альянс», б – яровой овес сорта «Маручак», с – яровой ячмень сорта «Никита»

Figure 1. Research samples: a – spring soft wheat of the Sibirsky Alyans variety, b – spring oats of the Maruchak variety, c – spring barley of the Nikita variety



Рисунок 2. Дизайн эксперимента

Figure 2. Experiment scheme

Культивирование вели в термостате ТСО-1/80 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) при температуре  $28 \pm 2$  °С в течение 48 ч [50]. Далее делали 5 пересевов истощающим штрихом на агаризованную среду Луриа-Бертани в модификации Миллера [51]. Чистоту выделенных штаммов бактерий контролировали микроскопически.

Для изучения культуральных признаков штаммов (цвет, форма, края, профиль, оптические свойства поверхности и размер колоний) производили посев суспензии чистых культур с низкой концентрацией на агаризованную среду LB с использованием шпателя Дригальского. Культивировали при температуре  $28 \pm 2$  °С в течение 24 ч.

Для определения морфологических признаков фиксированный мазок окрашивали метиленовым голубым и микроскопировали с объективом 90× или 100× [52]. Проводили окраску по методу Грама с помощью КОН-

теста для определения биохимических свойств клеточной стенки бактерий [53].

Идентификацию выделенных бактерий проводили на автоматическом микробиологическом анализаторе Vitex 2 Compact (BioMerieux, Франция) с использованием карт ID-GP (грамположительные микроорганизмы) и ID-GN (грамотрицательные микроорганизмы). Бактериальные культуры выращивали на агаризованной питательной среде – колумбийском агаре с кровью (BioVitrum, Швеция) в течение 48 ч при  $28 \pm 2$  °С, затем готовили суспензию штаммов в 2 мл дистиллированной воды до оптической плотности 2,70–3,30 по шкале МакФарланда с помощью денситометра Densitochek plus (BioMerieux, Франция) [54].

Для выявления способности микроорганизмов к синтезу индолил-3-уксусной и гибберелиновой кислот готовили суспензию бактерий согласно методике, указанной выше, при этом оптическую плотность

бактериальных культур до 0,8–1,0 по шкале МакФарланда. Затем 1 мл суспензии переносили в 10 мл бульона LB. Культивирование осуществляли в шейкер-инкубаторе при условиях, указанных выше, в течение 48 ч. Полученную суспензию центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин для отделения клеток от культуральной жидкости.

Чтобы обнаружить содержание индолил-3-уксусной кислоты 1 мл супернатанта смешивали с 1 мл реактива Сальковского. Выдерживали в темном месте при комнатной температуре в течение 30 мин. Концентрацию индолил-3-уксусной кислоты определяли по спектроскопическому поглощению (535 нм) в соответствии со стандартной кривой, полученной с различными концентрациями стандартного раствора индолил-3-уксусной кислоты (Диа-М, Россия) с концентрацией от 1 до 40 мг/мл [17].

Для вычисления количества синтезируемой гиббереллиновой кислоты к 2 мл культуральной жидкости добавляли по 280 мкл 1 М раствора ацетата цинка и 10,6 % раствора ферроцианида III калия, энергично встряхивали. Центрифугировали в течение 10 мин при 4500 об/мин. Затем смешивали полученный супернатант с 30 % соляной кислотой в соотношении 1:1 и выдерживали в течение 75 мин. Оптическую плотность измеряли по отношению к 5 % соляной кислоте на спектрофотометре UV 1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 254 нм. Количество синтезируемой гиббереллиновой кислоты определяли по калибровочному графику стандартного раствора гиббереллиновой кислоты (Диа-М, Россия) в пределах от 200 до 1200 мкг/мл [55].

Для оценки способности выделенных микроорганизмов фиксировать азот использовали методику, описанную в работе Ю. Р. Серазетдиновой с соавторами [56]. Бактериальную суспензию готовили аналогично способу, описанному в методике определения способности к синтезу гибберелиновой и индолил-3-уксусной кислот, на жидкой питательной среде следующего состава, г/л: сахароза (Сигма Тек, Россия) – 20,0; магний сернокислый (Chem-ех, Россия) – 5,0; калий фосфорнокислый 2-замещенный (Chem-ех, Россия) – 1,0; натрий молибденовокислый (ХимРеактив, Россия) – 0,005; натрий хлористый (ЛенРеактив, Россия) – 5,0; железо (II) сернокислое (ХимРеактив, Россия) – 0,01; кальций углекислый

(ХимРеактив, Россия) – 2,0. Культивировали при температуре  $28 \pm 2$  °С и скорости вращения 110 об/мин в течение 48 ч. Для отделения клеток культуральную жидкость центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин. Количество азота в бесклеточной культуральной жидкости определяли при помощи анализатора азота Rapid N Cube (Elementar, Германия).

Для определения способности к солюбилизации фосфатов суточную культуру исследуемых бактерий точно высевали на среду следующего состава, г/л: глюкоза (Сигма Тек, Россия) – 20,0; марганец (II) сернокислый (ХимРеактив, Россия) – 0,01; кальций фосфорнокислый (Chem-ех, Россия) – 5,0; натрий хлористый – 0,2 г/л; железо (III) сернокислое (ЛенРеактив, Россия) – 0,01; магний сернокислый – 0,1; агар бактериологический (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) – 15,0. Культивировали при  $28 \pm 2$  °С в течение 96 ч. [57]. Для измерения количественного показателя определяли эффективность солюбилизации фосфата ( $\text{Эф}_{\text{сф}}$ , %) по формуле:

$$\text{Эф}_{\text{сф}} = \frac{D_{\text{к+а}}}{D_{\text{к}}} \times 100$$

где  $D_{\text{к+а}}$  – диаметр колонии вместе с ареолом, см;  $D_{\text{к}}$  – диаметр колонии, см.

**Ранжирование показателей.** Для отбора перспективных микроорганизмов необходимо ранжировать показатели, отвечающие за стимулирование роста и развития растений [58]. Значимость показателей представлена в таблице 2, баллы – в таблице 3.

Лабораторная апробация перспективных штаммов проводилась в соответствии с методикой, описанной в раннее опубликованной работе [59].

С целью сравнения и оценки биологической активности выделенных штаммов микроорганизмов исполь-

Таблица 2. Значимость показателей PGP-свойств бактерий

Table 2. PGP properties of bacteria: significance

Показатель	Значимость
Синтез ИУК	0,15
Синтез ГК	0,15
Фиксация азота	0,50
Солюбилизация фосфора	0,20

Таблица 3. Балльная оценка показателей PGP-свойств бактерий

Table 3. PGP properties of bacteria: score

Показатель	Балл				
	1	2	3	4	5
Синтез ИУК, мкг/мл	менее 999	1000–2999	3000–4999	5000–6999	7000–9000
Синтез ГК, мкг/мл	менее 199	200–399	400–649	650–899	900–1200
Фиксация азота, мкг/л	менее 199	200–349	350–499	500–649	650–800
Солюбилизация фосфора, %	менее 0,99	1,00–1,09	1,10–1,29	1,30–1,49	1,50–1,70

зовали стандартные штаммы бактерий, предоставленные Национальным биоресурсным центром Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»:

– *Azspirillum brasilense* В-11094. Штамм выделен из корней росички лежачей (*Digitaria decumbens* L.) в Бразилии. Штамм характеризуется способностью к фиксации атмосферного азота, а также продуцированию полисахаридов;

– *Azotobacter chroococcum* В-8739. Штамм характеризуется способностью к фиксации атмосферного азота.

Все исследования проводились в 3-кратной повторности. Полученные значения данных выражали как среднее значение трех измерений со стандартным отклонением. Анализ статистических данных осуществляли при помощи Microsoft Office Excel 2007. Статистический анализ полученных данных проводили

с помощью одномоментного парного критерия Стьюдента по каждой паре интересов [60]. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Результаты исследования активности выделенных микроорганизмов оценивали с помощью анализа ANOVA с апостериорным критерием Шеффе.

### Результаты и их обсуждение

Из образцов сельскохозяйственных культур было выделено 7 микроорганизмов: из пшеницы *Triticum* L. – Tri 1, Tri 2; из овса *Avena sativa* L. – Ave 1, Ave 2; из ячменя *Hordeum* L. – Hor 1, Hor 2, Hor 3. Культуральные и морфологические признаки представлены в таблице 4.

Рост исследуемых микроорганизмов на чашках Петри представлен на рисунке 3.

По результатам морфологического исследования (табл. 4) выявлено, что наибольшее количество мик-

Таблица 4. Культуральные и морфологические признаки выделенных микроорганизмов

Table 4. Cultural and morphological properties of isolates

Номер микроорганизма	Признаки	
	Культуральные	Морфологические
Tri 1	Колонии желтые, масляные колонии округлой формы с ровными краями, плоские, диаметром в среднем 1,0 мм	Бациллы – в среднем 0,788×0,331 мкм, грамтрицательные
Tri 2	Колонии прозрачные, глянцевые, округлой формы с ровными краями, приподнятые, диаметром в среднем 2,5 мм	Бациллы – в среднем 1,108×0,520 мкм, грамположительные
Ave 1	Колонии белого цвета, масляные, округлой формы с ровными краями, плоские, диаметром в среднем 2,0 мм	Бациллы – в среднем 0,716×0,266 мкм, грамположительные
Ave 2	Колонии желтые, глянцевые, приподнятые, округлые с ровными краями, диаметром в среднем 1,0 мм	Бациллы – в среднем 0,716×0,352 мкм, грамтрицательные
Hor 1	Колонии белые, масляные, округлой формы с ровными краями, приподнятые, диаметром в среднем 1,5 мм	Бациллы – в среднем 0,759×0,328 мкм, грамположительные
Hor 2	Колонии белые, глянцевые, приподнятые, округлой формы с ровными краями, диаметром в среднем 2,0 мм	Бациллы – в среднем 0,809×0,451 мкм, грамположительные
Hor 3	Колонии белые, глянцевые, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметром в среднем 2,0 мм	Бациллы – в среднем 0,750×0,344 мкм, грамположительные



Рисунок 3. Рост выделенных микроорганизмов в чашке Петри на агаризованной среде LB

Figure 3. Isolates in a Petri dish on LB agar medium

роорганизмов являются грамположительными, за исключением Tri 1, Ave 2. Результаты исследования биохимических свойств выделенных микроорганизмов представлены в таблицах 5 и 6.

По результатам проведенных исследований выявили принадлежность штаммов: Tri 1 – *Pantoea allii*

(с вероятностью 95 %); Tri 2 – *Bacillus subtilis* (с вероятностью 90 %); Ave 1 – *Bacillus subtilis* (с вероятностью 96 %); Ave 2 – *Pantoea allii* (с вероятностью 98 %); Hor 1 – *Bacillus subtilis* (с вероятностью 94 %); Hor 2 – *Bacillus subtilis* (с вероятностью 89 %); Hor 3 – *Bacillus subtilis* (с вероятностью 85 %).

Таблица 5. Биохимические свойства грамположительных микроорганизмов

Table 5. Biochemical properties of Gram-positive microorganisms

№	Субстрат	Номер микроорганизма				
		Tri 2	Ave 1	Hor 1	Hor 2	Hor 3
1	D-амигдалин	–	–	–	–	–
2	Фосфоинозитид-специфическая фосфолипаза С	–	–	–	–	–
3	D-ксилоза	–	–	–	–	–
4	Аргининдигидролаза 1	–	–	–	–	–
5	$\beta$ -галактозидаза	–	+	+	+	–
6	$\alpha$ -глюкозидаза	+	+	–	+	+
7	Ala-Phe-Pro Ариламидаза	–	–	–	–	–
8	Циклодекстрин	–	–	–	–	–
9	L-аспартат-ариламидаза	–	–	–	–	–
10	$\beta$ -галактопиранозидаза	+	+	+	+	+
11	$\alpha$ -маннозидаза	–	–	–	–	–
12	Фосфатаза	–	–	–	–	–
13	Лейцинариламидаза	–	–	–	–	–
14	L-пролин ариламидаза	–	–	–	–	–
15	$\beta$ -глюкуронидаза	+	+	+	+	+
16	$\alpha$ -галактозидаза	+	+	+	+	–
17	L-пирролидонилариламидаза	–	–	–	–	–
18	$\beta$ -глюкуронидаза	+	+	+	+	+
19	Аланинариламидаза	–	–	–	–	–
20	Тирозин ариламидаза	–	–	–	–	–
21	D-сорбит	+	+	+	+	+
22	Уреаза	+	+	+	+	+
23	Устойчивость к полимиксину b	–	–	–	–	–
24	D-галактоза	–	–	–	–	–
25	D-рибоза	–	–	–	–	–
26	L-лактатное подщелачивание	–	–	–	–	–
27	Лактоза	–	–	–	–	–
28	N-ацетил-D-глюкозамин	–	–	–	–	–
29	D-мальтоза	–	–	–	–	–
30	Устойчивость к бацитрацину	–	–	–	–	–
31	Устойчивость к новобиоцину	–	–	–	–	–
32	Рост в присутствии 6,5 % NaCl	–	–	–	–	–
33	D-маннитол	+	+	+	+	+
34	D-манноза	–	–	–	–	–
35	Метил-В-Дглюкопиранозид	–	–	–	–	–
36	Пуллулан	–	–	–	–	–
37	D-раффиноза	–	–	–	–	–
38	Чувствительность к вибриостатику O/129	–	–	–	–	–
39	Салицин	–	–	–	–	–
40	Сахароза	+	+	+	+	+
41	D-трегалоза	–	–	–	–	–
42	Аргининдигидролаза 2	–	–	–	–	–
43	Резистентность к оптохину	–	–	–	–	+

Таблица 6. Биохимические свойства грамотрицательных микроорганизмов

Table 6. Biochemical properties of Gram-negative microorganisms

№	Субстрат	Номер микроорганизма		№	Субстрат	Номер микроорганизма	
		Tri 1	Ave 2			Tri 1	Ave 2
1	Ala-Phe-Pro-ариламидаза	–	–	25	Сахароза	+	+
2	Адонитол	+	+	26	D-тагатоza	–	–
3	L-пирролидонилариламидаза	+	+	27	D-трегалоза	+	+
4	L-арабитол	–	–	28	Цитрат (натрия)	–	–
5	D-целлобиоза	–	–	29	Малонат	+	+
6	$\beta$ -галактозидаза	+	+	30	5-кето-D-глюконат	+	+
7	Продуцирование H <sub>2</sub> S	–	–	31	L-лактатное подщелачивание	+	+
8	$\beta$ -N-ацетилглюкозаминидаза	–	–	32	$\alpha$ -глюкозидаза	–	–
9	Глутамилариламидаза рNA	–	–	33	Сукцинатное подщелачивание	–	–
10	D-глюкоза	+	+	34	$\beta$ -N-ацетилгалактозаминидаза	–	+
11	$\gamma$ -глутамилтрансфераза	–	–	35	$\alpha$ -галактозидаза	–	–
12	Сбраживание глюкозы	+	+	36	Фосфатаза	+	+
13	$\beta$ -глюкозидаза	–	–	37	Глицинариламидаза	–	–
14	D-мальтоза	–	–	38	Орнитиндекарбоксилаза	–	–
15	D-маннитол	+	+	39	Лизиндекарбоксилаза	–	–
16	D-манноза	+	–	40	Продуцирование L-гистидина	–	–
17	$\beta$ -ксилозидаза	–	–	41	Кумарат	+	+
18	$\beta$ -аланинариламидаза рNA	–	–	42	$\beta$ -глюкоронидаза	–	–
19	L-пролин-ариламидаза	–	–	43	Чувствительность к вибриостатику O/129	–	–
20	Липаза	–	–	44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза	–	–
21	Палатиноза	–	–	45	Продуцирование L-малата	–	–
22	Тирозин-ариламидаза	–	–	46	Реактив Элмана	–	–
23	Уреаза	–	–	47	Продуцирование L-лактата	–	–
24	D-сорбит	+	+				

Таблица 7. Активность выделенных микроорганизмов

Table 7. Activity of isolates

Номер микроорганизма	Количество синтезируемой ИУК, мкг/мл	Количество синтезируемой ГК, мкг/мл	Содержание азота, мкг/мл	Индекс солюбилизации фосфатов
<i>Pantoea allii</i> Tri 1	8441 ± 251 <sup>a</sup>	234 ± 6 <sup>a</sup>	120 ± 3 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,03 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> Tri 2	2030 ± 59 <sup>b</sup>	213 ± 5 <sup>a</sup>	160 ± 4 <sup>a</sup>	–
<i>Bacillus subtilis</i> Ave 1	7100 ± 210 <sup>b</sup>	343 ± 8 <sup>b</sup>	790 ± 22 <sup>b</sup>	1,60 ± 0,03 <sup>b</sup>
<i>Pantoea allii</i> Ave 2	4840 ± 143 <sup>r</sup>	276 ± 7 <sup>b</sup>	670 ± 19 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,02 <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> Hor 1	4490 ± 131 <sup>n</sup>	409 ± 11 <sup>r</sup>	760 ± 22 <sup>r</sup>	1,44 ± 0,03 <sup>r</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> Hor 2	8344 ± 250 <sup>a</sup>	405 ± 10 <sup>r</sup>	30,2 ± 0,8 <sup>n</sup>	1,00 ± 0,02 <sup>n</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> Hor 3	4650 ± 138 <sup>n</sup>	342 ± 9 <sup>b</sup>	750 ± 22 <sup>r</sup>	1,44 ± 0,04 <sup>c</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> B-11094	0,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	1060 ± 30 <sup>n</sup>	118 ± 3 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,01 <sup>ад</sup>
<i>Azotobacter chroococcum</i> B-8739	0,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	1100 ± 32 <sup>c</sup>	151 ± 3 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>b</sup>

Примечание: <sup>a-c</sup> – достоверность различий между микроорганизмами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанная методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе. При отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков.

Note: <sup>a-c</sup> – the values indicate reliable differences between microorganisms within one parameter as calculated by the ANOVA method with the Scheffe post hoc test. The letter indices are the same if no reliable differences were detected.

Для выявления наиболее перспективных штаммов оценивали способность изолятов к синтезу индолил-3-уксусной и гиббереллиновой кислот, фиксации азота и солюбилизации фосфатов. Результаты анализов представлены в таблице 7:

1. В результате исследования выявлено, что количество синтезируемой индолил-3-уксусной кислоты варьировалось от 0,5 до 8441 мкг/мл. Наибольшую активность (более 7000 мкг/мл) проявили 3 штамма: *Pantoea allii* Tri 1 (8441 ± 251 мкг/мл),

*B. subtilis* Hor 2 ( $8344 \pm 250$  мкг/мл) и *B. subtilis* Ave 1 ( $7100 \pm 210$  мкг/мл).

2. Количество синтезируемой гиббереллиновой кислоты варьировалось от 213 до 1100 мкг/мл. Наибольшей активностью (более 900 мкг/мл) обладали 2 микроорганизма: *A. chroococcum* B-8739 ( $1100 \pm 32$  мкг/мл) и *A. brasilense* B-11094 ( $1060 \pm 30$  мкг/мл).

3. Содержание азота варьировалось в пределах от 30 до 790 мкг/мл. Наибольшую активность (более 650 мкг/мл) проявили 4 штамма: *B. subtilis* Ave 1 ( $790 \pm 22$  мкг/мл), *B. subtilis* Hor 1 ( $760 \pm 22$  мкг/мл), *B. subtilis* Hor 3 ( $750 \pm 22$  мкг/мл) и *P. allii* Ave 2 ( $670 \pm 19$  мкг/мл).

4. Индекс солюбилизации фосфатов находился в диапазоне от 0,92 до 1,60. Наибольшей активностью (более 1,50) обладал штамм *B. subtilis* Ave 1 (1,60).

В современной научной литературе освещается способность некоторых представителей рода *Pantoea* к продуцированию ИУК. R. K. Singh и соавторы выявили, что эндофитный штамм *P. cypripedii* AF1 продуцировал ИУК в количестве от 100 до 250 мкг/мл и проявлял способность к фиксации атмосферного азота [61]. Фосфатсолюбилизирующий штамм *P. rhizosphaerae* sp. продемонстрировал способность к синтезу ИУК, а также сидерофоров [62]. *P. agglomerans* NCTC9381, выделенная в исследовании A. Rfaki и др., обладала способностью продуцировать индоллил-3-уксусную кислоту и сидерофоры.

Тем не менее результаты, полученные авторами, указывают на то, что метаболические пути представителей рода *Pantoea* значительно разнятся. Например, *P. vagans* LMG 24199 не обладала способностью к синтезу ростостимулирующих веществ [63]. У представителей рода *Bacillus* обнаружена способность к синтезу фитогормонов, в частности ИУК. J. Shao и др. утверждали, что ростостимулирующая способность штамма *B. amyloliquefaciens* SQR9, выделенного из ризосферы огурца, во многом обусловлена способностью к продуцированию ИУК. Кроме того, штамм продуцировал внеклеточную фитазу и летучие компоненты, включая ацетоин, 2,3-бутандиол [64]. Отмечена способность к синтезу данного фитогормона и у *B. cereus*. В исследовании M. Özdal и др. изоляты этого вида, выделенные из ризосферной почвы, продуцировали ИУК в стационарной фазе роста [65]. Синтезировал ИУК и *B. megaterium* VM5, выращиваемый на среде, содержащей L-триптофан [66]. Способность *Azospirillum* продуцировать фитогормоны хорошо описана в современной научной литературе. D. Rivera и соавторы указали на способность штаммов *A. brasilense* Sp245 и Az39 продуцировать ИУК при наличии в среде L-триптофана. Авторы отметили, что биосинтез ИУК ингибируется присутствием нескольких L-аминокислот (метианин, валин, цистеин, серин), вероятно, из-за нарушений в клеточном метаболизме [67]. Доказательства способности *Azotobacter* продуцировать ИУК представлены в современной научной литературе в меньшей степени [68].

Синтез микроорганизмами другого важного фитогормона – гиббереллиновой кислоты – гораздо менее изучен. L. Lv и соавторы предположили, что в основе стимулирования роста растений представителями *Pantoea* лежит производство этого фитогормона и ряд других перспективных для сельского хозяйства свойств, в частности фиксация атмосферного азота, солюбилизация фосфатов, биосинтез сидерофоров, экзополисахаридов, дезаминазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты [69]. Исследования G. Lenin и M. Jayanthi показали, что потенциал к синтезу ГК у представителей рода *Azotobacter* намного выше, чем у родов *Pseudomonas* и *Bacillus* [70]. Наше исследование показало аналогичные результаты, *A. chroococcum* B-8739 занял лидирующие позиции по продуцированию гиббереллиновой кислоты в сравнении с представителями родов *Pantoea* и *Bacillus*. В то же время значительной разницы в продуцировании гиббереллиновой кислоты с представителем рода *Azospirillum* отмечено не было.

Ранжирование полученных данных представлено в таблице 8 и на рисунке 4.

Таким образом, по результатам ранжирования PGR-свойств для дальнейшего анализа выбрано 2 штамма (ранг 4,2 и более): *B. subtilis* Ave 1 (ранг 4,55) и *B. subtilis* Hor 1 (ранг 4,20).

Лабораторная апробация перспективных штаммов представлена в таблицах 9–11.

Статистически значимыми результатами по отношению к контрольному варианту является длина побега ( $149 \pm 3$  мм) и длина корня ( $89 \pm 2$  мм) при обработке *B. subtilis* Ave 1.

Статистически значимыми результатами по отношению к контрольному варианту является энергия прорастания ( $75 \pm 2$  %), всхожесть (84 %) и длина побега ( $145 \pm 3$  мм) при обработке *B. subtilis* Ave 1, длина побега ( $143 \pm 2$  мм) при обработке *B. subtilis* Hor 1.

Статистически значимыми результатами по отношению к контрольному варианту является длина побега ( $148 \pm 3$  мм) и длина корня ( $90 \pm 3$  мм) при обработке *B. subtilis* Ave 1.

Полученные результаты подтверждаются исследованиями других ученых. Ростостимулирующие штаммы *Bacillus* spp. способствовали ускоренному росту другой зерновой культуры – пшеницы [71]. Исследования А. Платонова и соавторов показали, что коммерческие препараты на основе *B. subtilis* и *B. megaterium* оказывают положительное влияние на ростовые процессы, фотосинтетические параметры и зерновую продуктивность овса [72]. Солеустойчивые штаммы *Bacillus*, способные продуцировать индоллил-3-уксусную кислоту, оказывали положительное влияние на рост овса, в частности, в условиях солевого стресса [73]. В исследовании S. Kumari и соавторов показано, что фосфатсолюбилизирующий штамм *B. subtilis* DR2 способствует интенсификации роста ячменя [74].

Таблица 8. Ранжирование свойств бактерий

Table 8. Ranged bacterial properties

Номер микроорганизма	Балл				Ранг			
	ИУК	ГК	Азот	Фосфор	ИУК	ГК	Азот	Фосфор
<i>Pantoea allii</i> Tri 1	5	2	1	4	0,75	0,30	0,5	0,8
<i>Bacillus subtilis</i> Tri 2	2	2	1	1	0,30	0,30	0,5	0,2
<i>Bacillus subtilis</i> Ave 1	5	2	5	5	0,75	0,30	2,5	1,0
<i>Pantoea allii</i> Ave 2	3	2	5	2	0,45	0,30	2,5	0,8
<i>Bacillus subtilis</i> Hor 1	3	3	5	4	0,45	0,45	2,5	0,8
<i>Bacillus subtilis</i> Hor 2	5	3	1	2	0,75	0,45	0,5	0,4
<i>Bacillus subtilis</i> Hor 3	3	2	5	4	0,45	0,30	2,5	0,8
<i>Azospirillum brasilense</i> B-11094	1	5	1	1	0,15	0,15	0,5	0,2
<i>Azotobacter chroococcum</i> B-8739	1	5	1	1	0,15	0,15	0,5	0,2

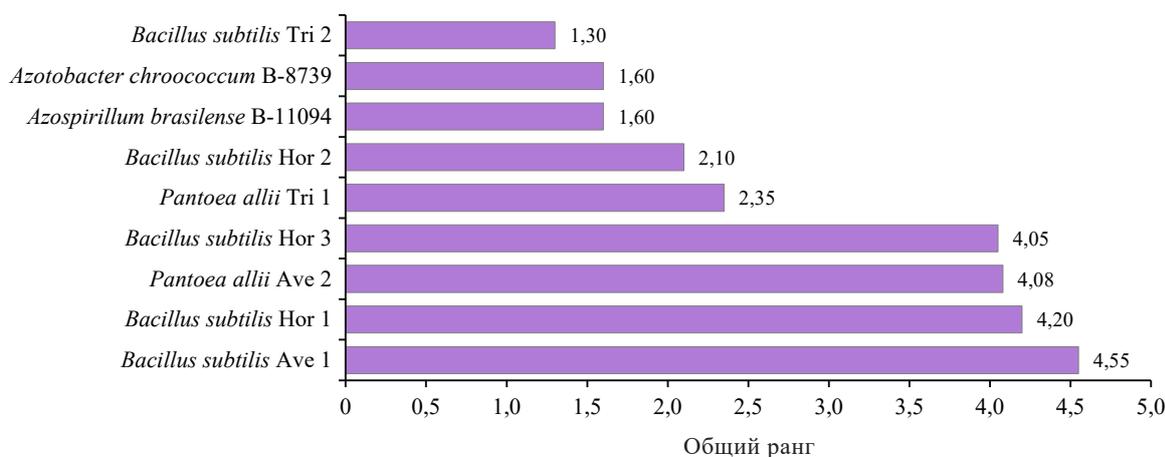


Рисунок 4. Ранжирование исследуемых бактериальных штаммов

Figure 4. Ranged bacterial strains

Таблица 9. Лабораторная апробация перспективных штаммов на яровой мягкой пшенице сорта «Сибирский Альянс»

Table 9. Effect of strains on spring wheat of the Sibirsky Alyans variety

Варианты опыта	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина побега, мм	Длина корня, мм
Контроль	69 ± 2	75 ± 2	132 ± 4	80 ± 2
Обработка <i>Bacillus subtilis</i> Ave 1	71 ± 4 Tst = 0,45; p = 0,68	80 ± 2 Tst = 1,77; p = 0,18	149 ± 3 Tst = 3,40; p = 0,04	89 ± 2 Tst = 3,18; p = 0,05
Обработка <i>Bacillus subtilis</i> Hor 1	73 ± 3 Tst = 1,11; p = 0,35	76 ± 3 Tst = 0,28; p = 0,80	145 ± 3 Tst = 2,60; p = 0,08	84 ± 1 Tst = 1,79; p = 0,17

Таблица 10. Лабораторная апробация перспективных штаммов на яровом овсе сорта «Маручак»

Table 10. Effect of strains on spring oats of the Maruchak variety

Варианты опыта	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина побега, мм	Длина корня, мм
Контроль	65 ± 2	76 ± 2	130 ± 3	84 ± 2
Обработка <i>Bacillus subtilis</i> Ave 1	75 ± 2 Tst = 3,54; p = 0,04	84 ± 1 Tst = 3,58; p = 0,04	145 ± 3 Tst = 3,54; p = 0,04	91 ± 3 Tst = 1,94; p = 0,15
Обработка <i>Bacillus subtilis</i> Hor 1	72 ± 3 Tst = 1,94; p = 0,15	79 ± 2 Tst = 1,06; p = 0,37	143 ± 2 Tst = 3,30; p = 0,04	88 ± 2 Tst = 1,41; p = 0,25

Таблица 11. Лабораторная апробация перспективных штаммов на яровом ячмене сорта «Никита»

Table 11. Effect of strains on spring barley of the Nikita variety

Варианты опыта	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина побега, мм	Длина корня, мм
Контроль	70 ± 2	75 ± 3	135 ± 3	79 ± 2
Обработка <i>Bacillus subtilis</i> Ave 1	75 ± 3 Tst = 1,39; <i>p</i> = 0,26	82 ± 3 Tst = 1,65; <i>p</i> = 0,20	148 ± 3 Tst = 3,06; <i>p</i> = 0,05	90 ± 3 Tst = 3,05; <i>p</i> = 0,05
Обработка <i>Bacillus subtilis</i> Hor 1	72 ± 3 Tst = 0,55; <i>p</i> = 0,62	80 ± 4 Tst = 1,00; <i>p</i> = 0,40	145 ± 3 Tst = 2,36; <i>p</i> = 0,10	83 ± 2 Tst = 1,41; <i>p</i> = 0,25

### Выводы

Пшеница, ячмень и овес – ценные сельскохозяйственные культуры, обеспечивающие продовольственную безопасность во многих странах мира. Их продуктивность может значительно снижаться под воздействием различных факторов в особенности из-за недостаточного содержания питательных элементов в почвах. Биологические удобрения на основе эндофитных микроорганизмов могут способствовать повышению урожайности зерновых культур, представляя собой экологичную альтернативу минеральным удобрениям.

В ходе исследования выделено 7 изолятов микроорганизмов, 2 из которых являлись эндофитами пшеницы, два – овса и 3 – ячменя. Были охарактеризованы культурально-морфологические и биохимические свойства с целью идентификации видовой принадлежности. Идентификация показала, что выделенные микроорганизмы относились к штаммам *Pantoea allii* Tri 1, *Bacillus subtilis* Tri 2, *Bacillus subtilis* Ave 1, *Pantoea allii* Ave 2, *Bacillus subtilis* Hor 1, *Bacillus subtilis* Hor 2, *Bacillus subtilis* Hor 3. Для выбора наиболее перспективных штаммов оценили их ростостимулирующую активность, а также провели ранжирование полученных результатов в соответствии с важностью показателей для данной работы. Выбраны штаммы *B. subtilis* Ave 1 (продуцирование индолил-3-уксусной кислоты – 7100 мкг/мл, гиббереллиновой кислоты – 343 мкг/мл, фиксация атмосферного азота – 790 мкг/мл, индекс солюбилизации фосфатов – 1,60) и *B. subtilis* Hor 1 (продуцирование индолил-3-уксусной кислоты – 4490 мкг/мл, гиббереллиновой кислоты – 408,9 мкг/мл, фиксация атмосферного азота – 760 мкг/мл, индекс солюбилизации фосфатов – 1,44).

Дальнейшие исследования показали, что обработка штаммами положительно сказывается на росте зерно-

вых культур. Статистически значимое увеличение длины побега и корня наблюдалось при обработке пшеницы сорта «Сибирский Альянс» штаммом *B. subtilis* Ave 1. Обработка овса сорта «Марушак» данным штаммом привела к достоверному увеличению энергии прорастания, всхожести и длины побега. В то время как обработка штаммом *B. subtilis* Hor 1 оказывала значительное влияние только на длину побега. При обработке ячменя сорта «Никита» лидирующие позиции в стимулировании роста занял штамм *B. subtilis* Ave 1: отмечено статистически значимое увеличение длины побега и корня относительно контрольных вариантов. При обработке ячменя штаммом *B. subtilis* Hor 1 наблюдали увеличение ростовых показателей, но разница не являлась статистически значимой. Таким образом, наибольшими перспективами в интенсификации роста сельскохозяйственных культур обладает штамм *B. subtilis* Ave 1.

### Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в подготовке и написании статьи.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Contribution

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

### Conflict of interest

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

### References/Список литературы

1. Kachutova AA. Efficiency of grain production – basis of food safety of the country. Bulletin of NGIEI. 2013;(3):76–88. (In Russ.). [Качутова А. А. Эффективное производство зерна – основа продовольственной безопасности страны // Вестник НГИЭИ. 2013. № 3. С. 76–88.]. <https://elibrary.ru/PZFFSL>
2. Albahri G, Alyamani AA, Badran A, Hijazi A, Nasser M, Maresca M, et al. Enhancing essential grains yield for sustainable food security and bio-safe agriculture through latest innovative approaches. Agronomy. 2023;13(7):1709. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071709>

3. Serazetdinova Y, Borodina E, Kolpakova D, Frolova A, Fotina N, Tikhonov S, *et al.* The biopotential of extremophilic microorganisms isolated from Kuzbass for protection and growth stimulation of oat (*Avena sativa* L.). BIO Web of Conferences. 2024;82:03009. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20248203009>
4. Sullivan P, Arendt E, Gallagher E. The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods. Trends in Food Science and Technology. 2013;29(2):124–134. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.10.005>
5. Langridge P. Economic and academic importance of barley. In: Stein N, Muehlbauer GJ, editors. The Barley Genome. Cham: Springer International Publishing; 2018. pp. 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92528-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92528-8_1)
6. Kolmanič A, Sinkovič L, Nečemer M, Ogrinc N, Meglič V. The effect of cultivation practices on agronomic performance, elemental composition and isotopic signature of spring Oat (*Avena sativa* L.). Plants. 2022;11(2):169. <https://doi.org/10.3390/plants11020169>
7. FAOSTAT [Internet]. [cited 2024 Jun 5]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
8. Daniel AI, Fadaka AO, Gokul A, Bakare OO, Aina O, Fisher S, *et al.* Biofertilizer: The future of food security and food safety. Microorganisms. 2022;10(6):1220. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>
9. Prosekov AYu. Modern aspects of food production. Kemerovo: Kemerovo Technological Institute of Food Industry, 2005. 380 p. (In Russ.). [Просеков А. Ю. Современные аспекты производства продуктов питания. Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2005. 381 с.]. <https://elibrary.ru/ZRZGCT>
10. Abebe TG, Tamtam MR, Abebe AA, Abtemariam KA, Shigut TG, Dejen YA, *et al.* Growing use and impacts of chemical fertilizers and assessing alternative organic fertilizer sources in Ethiopia. Applied and Environmental Soil Science. 2022;2022(1):1–14. <https://doi.org/10.1155/2022/4738416>
11. Yurina TA, Tkalenko AE. Review of innovative drugs for biologization of agricultural production. AgroForum. 2020;(1):51–53. (In Russ.). [Юрина Т. А., Ткаленко А. Е. Обзор инновационных препаратов для биологизации сельскохозяйственного производства // АгроФорум. 2020. № 1. С. 51–53.]. <https://elibrary.ru/WLIKOC>
12. Kumar R, Kumawat N, Sahu YK. Role of biofertilizers in agriculture. Popular Kheti. 2017;5(4):63–66.
13. Mahmud AA, Upadhyay SK, Srivastava AK, Bhojiya AA. Biofertilizers: A nexus between soil fertility and crop productivity under abiotic stress. Current Research in Environmental Sustainability. 2021;3:100063. <https://doi.org/10.1016/j.crsust.2021.100063>
14. Chaudhary P, Agri U, Chaudhary A, Kumar A, Kumar G. Endophytes and their potential in biotic stress management and crop production. Frontiers in Microbiology. 2022;13:933017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.933017>
15. Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, *et al.* Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. Frontiers in Microbiology. 2017;8:2552. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>
16. Milentyeva IS, Fotina NV, Zharko MYu, Proskuryakova LA. Microbial treatment and oxidative stress in agricultural plants. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(4):750–61. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-4-2403>
17. Asyakina LK, Vorob'eva EE, Proskuryakova LA, Zharko MYu. Evaluating extremophilic microorganisms in industrial regions. Foods and Raw Materials. 2023;11(1):162–71. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-556>
18. Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science. 2018;9:1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
19. Mahanty T, Bhattacharjee S, Goswami M, Bhattacharyya P, Das B, Ghosh A, *et al.* Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. Environmental Science and Pollution Research. 2017;24:3315–3335. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
20. Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews. 2000;24(4):487–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
21. Iqbal R, Valipour M, Ali B, Zulfiqar U, Aziz U, Zaheer MS, *et al.* Maximizing wheat yield through soil quality enhancement: A combined approach with *Azospirillum brasilense* and bentonite. Plant Stress. 2024;11:100321. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100321>
22. Fukami J, Cerezini P, Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Express. 2018;8:73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
23. Turan M, Gulluce M, Von Wirén N, Sahin F. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 2012;175(6):818–826. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200054>
24. Aroca R. Plant responses to drought stress: from morphological to molecular features. Heidelberg: Springer; 2012. p. 466. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0>
25. Kızılkaya R. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. Ecological Engineering. 2008;33(2):150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.02.011>

26. Dal Cortivo C, Ferrari M, Visioli G, Lauro M, Fornasier F, Barion G, et al. Effects of Seed-Applied Biofertilizers on Rhizosphere Biodiversity and Growth of Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Field. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11:72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00072>
27. Mishra P, Dash D. Rejuvenation of biofertilizer for sustainable agriculture and economic development. *Consilience: The Journal of Sustainable Development*. 2014;11(1):41–61.
28. Das HK. *Azotobacters* as biofertilizer. *Advances in Applied Microbiology*. 2019;108:1–43. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.07.001>
29. Harper SHT, Lynch JM. Effects of *Azotobacter chroococcum* on barley seed germination and seedling development. *Journal of General Microbiology*. 1979;112(1):45–51. <https://doi.org/10.1099/00221287-112-1-45>
30. Bageshwar UK, Srivastava M, Pardha-Saradhi P, Paul S, Gothandapani S, Jaat RS, et al. An environmentally friendly engineered *Azotobacter Strain* that replaces a substantial amount of urea fertilizer while sustaining the same wheat yield. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017;83(15):e00590-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00590-17>
31. Kopylov IP, Spyrydonov VH, Patyka VP. Identification of *Azospirillum* genus bacteria isolated from the spring wheat root zone. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2009;71:13–19.
32. Ayyaz K, Zaheer A, Rasul G, Mirza MS. Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016;47(3):542–550. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.035>
33. Camilios-Neto D, Bonato P, Wasseem R, Tadra-Sfeir MZ, Brusamarello-Santos LC, Valdameri G, et al. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. *BMC Genomics*. 2014;15:378. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-378>
34. Kumar V, Narula N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*. 1999;28:301–305. <https://doi.org/10.1007/s003740050497>
35. Iqbal Z, Ahmad M, Raza MA, Hilger T, Rasche F. Phosphate-Solubilizing *Bacillus* sp. Modulate Soil Exoenzyme Activities and Improve Wheat Growth. *Microbial Ecology*. 2024;87:31. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02340-5>
36. Iqbal Z, Ahmad M, Jamil M, Akhtar MFUZ. Appraising the potential of integrated use of *Bacillus* strains for improving wheat growth. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2020;24:1439–1448.
37. Kaur T, Devi R, Kumar S, Sheikh I, Kour D, Yadav AN. Microbial consortium with nitrogen fixing and mineral solubilizing attributes for growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Heliyon*. 2022;8(4):e09326. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09326>
38. Pang F, Tao A, Ayra-Pardo C, Wang T, Yu Z, Huang S. Plant organ- and growth stage-diversity of endophytic bacteria with potential as biofertilisers isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*. 2022;22:276. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03615-8>
39. Da Silva MF, De Souza Antônio C, De Oliveira PJ, Xavier GR, Rumjanek NG, De Barros Soares LH, et al. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant Soil*. 2012;356:231–243. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1242-3>
40. Cavalcante VA, Döbereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*. 1988;108:23–31. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
41. Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*. 1978;24:967–980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>
42. Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, Wuichet K, et al. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. *PLoS Genetics*. 2011;7(12):e1002430. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>
43. Khammas KM, Ageron E, Grimont PAD, Kaiser P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*. 1989;140(9):679–693. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(89\)90199-X](https://doi.org/10.1016/0923-2508(89)90199-X)
44. Baldani VLD, Alvarez MADB, Baldani JI, Döbereiner J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*. 1986;90:35–46. <https://doi.org/10.1007/BF02277385>
45. Bhatia R, Ruppel S, Narula N. Diversity studies of *Azotobacter* spp. from cotton-wheat cropping systems of India. *Journal of Basic Microbiology*. 2008;48(6):455–463. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800059>
46. Kumawat KC, Razdan N, Saharan K. Rhizospheric microbiome: Bio-based emerging strategies for sustainable agriculture development and future perspectives. *Microbiological Research*. 2022;254:126901. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126901>
47. Li H, Parmar S, Sharma VK, White JF. Seed endophytes and their potential applications. In: Verma SK, White, Jr JF, editors. *Seed Endophytes*. Cham: Springer International Publishing; 2019. pp. 35–54. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_3)

48. Sa R, He S, Han D, Liu M, Yu Y, Shang R, *et al.* Isolation and identification of a new biocontrol bacteria against *Salvia miltiorrhiza* root rot and optimization of culture conditions for antifungal substance production using response surface methodology. *BMC Microbiology*. 2022;22:231. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02628-5>
49. Amna, Ud Din B, Sarfraz S, Xia Y, Kamran MA, Javed MT, *et al.* Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC-deaminase producing *Bacillus* strains under induced salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;183:109466. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109466>
50. Masi C, Tebiso A, Selva Kumar KV. Isolation and characterization of potential multiple extracellular enzyme-producing bacteria from waste dumping area in Addis Ababa. *Heliyon*. 2023;9(2):e12645. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12645>
51. Wu SC, Gao J-K, Chang B-S. Isolation of lindane- and endosulfan-degrading bacteria and dominance analysis in the microbial communities by culture-dependent and independent methods. *Microbiological Research*. 2021;251:126817. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126817>
52. Borodina E, Asyakina L, Proskuryakova L, Osintseva M, Milentyeva I, Prosekov A. The potential of using plant-growth-stimulating bacteria in phytoremediation of coal dumps. *BIO Web of Conferences*. 2024;82:06011. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20248206011>
53. Medfu Tarekegn M, Zewdu Salilih F, Ishetu AI. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent Food and Agriculture*. 2020;6(1):1783174. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1783174>
54. Atuchin VV, Asyakina LK, Serazetdinova YuR, Frolova AS, Velichkovich NS, Prosekov AYu. Microorganisms for bioremediation of soils contaminated with heavy metals. *Microorganisms*. 2023;11(4):864. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040864>
55. Asyakina LK, Mudgal G, Tikhonov SL, Larichev TA, Fotina NV, Prosekov AYu. Study of the potential of natural microbiota of spring soft wheat to increase yield. *Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*. 2023;37(11):12–17. (In Russ.). [Исследование потенциала естественной микробиоты яровой мягкой пшеницы в повышении урожайности / Л. К. Асякина [и др.] // Достижения науки и техники АПК. 2023. Т. 37. № 11. С. 12–17.]. <https://elibrary.ru/HXXGEC>
56. Serazetdinova YuR, Fotina NV, Asyakina LK, Milentyeva IS, Prosekov AYu. Rhizobacteria for Reducing Biotic Stress in Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Caused by Phytopathogenic Fungi. Storage and Processing of Farm Products. 2023;(4):98–113. (In Russ.). [Ризобактерии для снижения биотического стресса яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), вызванного фитопатогенными грибами / Ю. Р. Серазетдинова [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. 2023. № 4. С. 98–113.]. <https://elibrary.ru/JTKRHL>
57. Asyakina LK, Isachkova OA, Kolpakova DE, Borodina EE, Boger VYu, Prosekov AYu. The effect of a microbial consortium on spring barley growth and development in the Kemerovo region, Kuzbass. *Grain Economy of Russia*. 2024;16(1):104–112. (In Russ.). <https://doi.org/10.31367/2079-8725-2024-90-1-104-112>
58. Fotina NV, Serazetdinova YuR, Kolpakova DE, Asyakina LK, Atuchin VV, Alotaibi KM, *et al.* Enhancement of wheat growth by plant growth-stimulating bacteria during phytopathogenic inhibition. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2024;60:103294. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103294>
59. Faskhutdinova ER, Fotina NV, Neverova OA, Golubtsova YuV, Mudgal G, Asyakina LK, *et al.* Extremophilic bacteria as biofertilizer for agricultural wheat. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(2):348–360. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-613>
60. Albassam M, Aslam M. Testing Internal Quality Control of Clinical Laboratory Data Using Paired *t*-Test under Uncertainty. *BioMed Research International*. 2021;5527845. <https://doi.org/10.1155/2021/5527845>
61. Singh RK, Singh P, Guo D-J, Sharma A, Li D-P, Li X, *et al.* Root-Derived Endophytic Diazotrophic Bacteria *Pantoea cypripedii* AF1 and *Kosakonia arachidis* EF1 Promote Nitrogen Assimilation and Growth in Sugarcane. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:774707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774707>
62. Ma Q, He S, Wang X, Rengel Z, Chen L, Wang X, *et al.* Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea rhizosphaerae* sp. nov. from *Acer truncatum* rhizosphere soil and its effect on *Acer truncatum* growth. *Frontiers in Plant Science*. 2023;14:1218445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1218445>
63. Rfaki A, Zennouhi O, Aliyat FZ, Nassiri L, Ibjibjen J. Isolation, selection and characterization of root-associated rock phosphate solubilizing bacteria in moroccan wheat (*Triticum aestivum* L.). *Geomicrobiology Journal*. 2020;37(3):230–241. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1694106>
64. Shao J, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R. Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biology and Fertility of Soils*. 2015;51:321–330. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0978-8>
65. Özdal M, Gür Özdal Ö, Sezen A, Algur ÖF. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by *Bacillus cereus* Immobilized Cells. *Cumhuriyet Science Journal*. 2016;37(3):212. <https://doi.org/10.17776/csj.34085>
66. Lee J-C, Whang K-S. Optimization of Indole-3-acetic Acid (IAA) Production by *Bacillus megaterium* BM5. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*. 2016;49(5):461–468. <https://doi.org/10.7745/KJSSF.2016.49.5.461>

67. Rivera D, Mora V, Lopez G, Rosas S, Spaepen S, Vanderleyden J, et al. New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. Journal of Applied Microbiology. 2018;125(6):1774–1785. <https://doi.org/10.1111/jam.14080>
68. Shokri D, Emtiazi G. Indole-3-Acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by taguchi design. Current Microbiology. 2010;61:217–25. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9600-y>
69. Lv L, Luo J, Ahmed T, Zaki HEM, Tian Y, Shahid MS, et al. Beneficial effect and *Potential* risk of *Pantoea* on rice production. Plants. 2022;11(19):2608. <https://doi.org/10.3390/plants11192608>
70. Lenin G, Jayanthi M. Indole Acetic Acid, Gibberellic Acid and Siderophore Production by PGPR Isolates from Rhizospheric Soils of *Catharanthus roseus*. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives. 2012;3(4):933–938
71. Dahiya A, Sharma R, Sindhu S, Sindhu SS. Resource partitioning in the rhizosphere by inoculated *Bacillus* spp. towards growth stimulation of wheat and suppression of wild oat (*Avena fatua* L.) weed. Physiology and Molecular Biology of Plants. 2019;25:1483–1495. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00710-3>
72. Platonov AV, Rassokhina II, Laptev GY, Bolshakov VN. Preparations Use Based on Bacteria of the Genus *Bacillus* to Increase the Yield of Oats (*Avena sativa* L.). AGRIVITA Journal of Agricultural Science. 2023;45(1):48–55. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v45i1.3757>
73. Mohan V, Devi KS, Anushya A, Revathy G, Viji Kuzhalvaimozhi G, Vijayalakshmi KS. Screening of Salt Tolerant and Growth Promotion Efficacy of Phosphate Solubilizing Bacteria. Journal of Academia and Industrial Research. 2017;5(12):168–172.
74. Kumari S, Kumar P, Kiran S, Kumari S, Singh A. Characterization of culture condition dependent, growth responses of phosphate solubilizing bacteria (*Bacillus subtilis* DR2) on plant growth promotion of *Hordeum vulgare*. Vegetos. 2023;37:266–276. <https://doi.org/10.1007/s42535-023-00589-2>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2544>  
<https://elibrary.ru/PJCBWR>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Продовольственный риск снижения качества жизни населения региона



Е. А. Морозова\*<sup>ORCID</sup>, Р. М. Котов<sup>ORCID</sup>,  
Е. Я. Пастухова<sup>ORCID</sup>, Н. М. Егорова<sup>ORCID</sup>

Кемеровский государственный университет<sup>ORCID</sup>, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 17.04.2024  
Принята после рецензирования: 06.05.2024  
Принята к публикации: 04.06.2024

\*Е. А. Морозова: [morea@inbox.ru](mailto:morea@inbox.ru),  
<https://orcid.org/0000-0003-2215-9808>  
Р. М. Котов: <https://orcid.org/0000-0003-0238-3466>  
Е. Я. Пастухова: <https://orcid.org/0000-0001-5518-1783>  
Н. М. Егорова: <https://orcid.org/0000-0002-0075-3542>

© Е. А. Морозова, Р. М. Котов, Е. Я. Пастухова,  
Н. М. Егорова, 2024



### Аннотация.

Качество жизни населения является важным индикатором уровня социально-экономического развития как территориального сообщества, так и общества в целом. В науке не сформировано единой системы показателей для определения качества жизни, рисков его снижения, угроз, связанных с потреблением продуктов питания. Цель работы – разработка методики определения продовольственного риска снижения качества жизни.

Объектами исследования являлись уровень потребления продуктов питания населением России и Кемеровской области – Кузбасса, индекс потребительских цен на продовольственные товары и продовольственный риск снижения качества жизни. Проводили анализ статистических данных за 2012–2022 гг., сравнение региональных данных с федеральными, определение степени их отклонения, которая в усредненном варианте отражает состояние продовольственного риска снижения качества жизни. В работе использовали традиционные теоретические методы исследований.

По пяти из девяти анализируемых продуктов питания Кемеровская область – Кузбасс стабильно отстает от среднероссийских показателей, особенно по таким видам продовольствия, как овощи и бахчевые культуры; масло растительное; фрукты и ягоды; немного меньше – по потреблению молочных продуктов и сахара. Потребление мяса и мясопродуктов в регионе ниже среднероссийского уровня, но отклонение незначительно. Примерно равны федеральный и региональный уровни потребления хлебных продуктов и яиц. Только по потреблению картофеля Кемеровская область – Кузбасс опережает Россию. Потребительские цены на продукты питания в регионе росли более медленными темпами, чем в целом по стране. Расчетный уровень продовольственного риска снижения качества жизни в анализируемый период составляет 10–11 %, что свидетельствует о стабильном отставании Кемеровской области – Кузбасса от общероссийских показателей доступности продуктов питания.

Оценка продовольственного риска снижения качества жизни важна для выявления проблем обеспечения продовольственной безопасности в регионе и разработки мер по ее укреплению.

**Ключевые слова.** Качество жизни, продовольствие, продукты питания, потребление, норма потребления, риск, продовольственная безопасность, Кузбасс

**Для цитирования:** Продовольственный риск снижения качества жизни населения региона / Е. А. Морозова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 837–847. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2544>

## Food Risks as an Indicator of the Quality of Life in the Region



Elena A. Morozova\*<sup>ID</sup>, Roman M. Kotov<sup>ID</sup>,  
Elena Ya. Pastukhova<sup>ID</sup>, Natalia M. Egorova<sup>ID</sup>

Kemerovo State University<sup>ROR</sup>, Kemerovo, Russia

Received: 17.04.2024  
Revised: 06.05.2024  
Accepted: 04.06.2024

\*Elena A. Morozova: [morea@inbox.ru](mailto:morea@inbox.ru),  
<https://orcid.org/0000-0003-2215-9808>  
Roman M. Kotov: <https://orcid.org/0000-0003-0238-3466>  
Elena Ya. Pastukhova: <https://orcid.org/0000-0001-5518-1783>  
Natalia M. Egorova: <https://orcid.org/0000-0002-0075-3542>

© E.A. Morozova, R.M. Kotov, E.Ya. Pastukhova, N.M. Egorova, 2024



### Abstract.

The quality of life is a complex characteristic of the level and conditions of people's life. This indicator reflects the degree of satisfaction, as well as the subjective perception of life and its individual aspects. In this regard, the quality of life is the most important indicator of the socio-economic development for separate communities and the nation as a whole. However, science has no unified system of indicators to determine the quality of life or its correlation with various threats, i.e., downside risks. Food consumption is an important element in assessing the quality of life, and food risk is a component of the overall downside risks. The research objective was to develop a methodology for determining food risks as an indicator of the quality of life. The authors studied the level of food consumption by the population of Russia as a whole and the population of the Kemerovo Region. The consumer food price index served as an indicator of food risks in the system of the quality of life. The study relied on standard research methods and involved a review of scientific sources and official documentation. Statistics for 2012–2022 underwent a comparative analysis of regional vs. federal data to determine the degree of deviation, which reflected the food risks to the quality of life.

The Kemerovo Region proved to lag behind the Russian average in five out of nine food products, i.e., vegetables and melons, vegetable oil, fruits and berries, dairy products, and sugar. The regional deviation was smaller in the case of meat and meat products. The consumption of bread products and eggs approximated the federal level. Potato consumption was above average. Food prices appeared to grow at a slower pace than in the country as a whole. The comparative analysis of actual vs. standard food consumption in the region demonstrated a severe long-term shortage of fresh fruits, berries, vegetables, melons, dairy products, oil, and meat in the diet of local residents, who try to compensate for this shortage with potatoes, eggs, bread, and bakery products, not to mention sugar. The estimated level of food risks for the quality of life proved to be 10–11%, i.e., a stable lag behind the all-Russian indicators of food availability.

Food risk assessment is an important indicator of the quality of life. It reveals problems in the regional food security and makes it possible to develop the necessary measures. Food risks can be reduced by increasing the local agricultural production, improving the trade logistics for specific goods, optimizing the regional food supply management, and promoting the healthy lifestyle.

**Keywords.** Quality of life, food, food products, consumption, consumption standards, risk, food security, Kuzbass

**For citation:** Morozova EA, Kotov RM, Pastukhova EYa, Egorova NM. Food Risks as an Indicator of the Quality of Life in the Region. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):837–847. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2544>

### Введение

Качество жизни населения на протяжении многих лет является важным индикатором благосостояния общества, территориальных сообществ, отдельных категорий людей и семей, о чем свидетельствуют формулировки целевых установок многочисленных программных документов федерального, регионального, муниципального, организационного уровней. В силу богатого содержания данной категории пока не сложи-

лось ее однозначное понимание, что затрудняет количественный и качественный анализ состояния качества жизни населения, а также влияния на него различных факторов. Условий и обстоятельств, которые воздействуют на качество жизни населения, достаточно много, что обуславливает необходимость не только их предвидения, но и расчета возможной силы влияния или риска.

Авторы исследования придерживаются точки зрения, что качество жизни – комплексная характерис-

тика. Такой подход свидетельствует, что, во-первых, качество жизни является многогранным феноменом, включающим в себя и уровень, и многочисленные условия существования населения, во-вторых, показывает, насколько на практике реализуются запросы и потребности жителей, в-третьих, включает в себя не только объективные, но и субъективные оценки людей обстоятельств своей жизнедеятельности.

Исследователи используют самые разные системы показателей для оценки как в целом качества жизни, так и его отдельных составляющих [1–5]. Изучив различные варианты определения качества жизни, предлагаемые учеными в 2000–2018 гг., М. В. Михайлова сгруппировала наиболее распространенные индикаторы в семь групп (уровень жизни, уровень развития инфраструктуры, экологическое состояние среды обитания, здоровье, личная безопасность, образование, занятость) [6]. В научных источниках можно встретить и множество других измерителей качества жизни, которые отражают такие сферы, как культура, политика, информационное пространство, жилищно-бытовые условия, морально-психологическая обстановка и др.

По нашему мнению, важным показателем качества жизни является уровень потребления продуктов питания, который демонстрирует степень удовлетворения одной из базовых потребностей человека – в пище, оказывает влияние на многие стороны его существования – здоровье, трудоспособность, настроение и т. п. Существуют официальные документы, в соответствии с которыми должны фиксироваться статистические данные, отражающие фактическое потребление продуктов питания, что составляет правовую и информационную базу для их анализа. Трудно не согласиться с мнением П. Д. Косинского и А. В. Харитоновой, которые утверждают, что «развитие общества, его главную ценность и богатство определяет человек, его интеллектуальный потенциал, физическое здоровье и творческая деятельность. <...> Качество питания людей воздействует на их здоровье, продолжительность жизни при рождении и воспроизводство здорового потомства» [7].

Большое количество подходов к измерению качества жизни свидетельствует о достаточно глубокой проработанности данного вопроса, но отдельные аспекты темы пока остаются слабо изученными. Проблематика рисков снижения качества жизни как в целом, так и по отдельным составляющим и их количественная оценка в научных источниках освещены фрагментарно. На описание предлагаемого инструмента определения риска снижения качества жизни по одному из компонентов – продовольственному – и нацелено данное исследование.

#### **Объекты и методы исследования**

В качестве объектов исследования выступают уровень потребления продуктов питания населением России и Кемеровской области – Кузбасса, индекс

потребительских цен на продовольственные товары и продовольственный риск снижения качества жизни.

Анализ уровня потребления продуктов питания посвящено немало трудов как зарубежных, так и российских исследователей [8–13]. Например, И. М. Станчин провел сопоставление российских данных за 100 лет и пришел к выводу, что по некоторым продуктам питания ситуация в XXI в. хуже, чем в XX в. [14]. Базовые категории, связанные с потреблением продуктов питания (потребительская корзина, набор потребительских товаров и услуг, минимальный набор продуктов питания и т. п.), с установлением соответствующих норм со стороны государства, отражены не только в нормативных документах, но и в научных публикациях [15, 16].

Потребление продуктов питания часто рассматривается через призму продовольственной безопасности [17–20], что вполне обосновано, поскольку, по утверждению А. И. Богачева и Л. Н. Дорофеевой, «проблема продовольственной безопасности на современном этапе экономического развития становится одной из важнейших для общества» [21].

Многие авторы анализируют вопросы потребления продуктов питания в контексте благосостояния населения, его покупательской способности, неравенства доходов [22–24]. Л. В. Скульская и Т. К. Широкова делают вывод, что «направляя средства для поддержания и наращивания производства сельскохозяйственной продукции, государство в цепочке: сельское хозяйство – перерабатывающая промышленность – розничная торговля фактически дотирует богатое население России, перераспределяя за счет розничных цен на продовольственные товары в пользу богатого населения страны общенародные средства в десятки млрд рублей» [25].

Направлениями научного изучения потребления продовольствия являются его влияние на здоровый образ жизни, роль государственных органов управления в регулировании соответствующих процессов [26, 27]. Н. А. Гречушкина утверждает, что «рационализация питания является важнейшим элементом социальной политики государства и одним из факторов формирования здорового образа жизни» [28].

Значительное количество научных работ посвящено анализу уровня потребления продуктов питания населением различных территориальных образований, российских регионов, как в динамике за определенный промежуток времени, так и в сравнении между собой [29–33]. В Кузбассе вопросы продовольственного обеспечения населения не оставались без внимания ученых. Научные исследования касались и теоретико-методологических основ проблематики, и прикладных аспектов [34–38].

Обеспеченность населения продуктами питания, возможность удовлетворять потребность в пище, безусловно, связаны с качеством его жизни. И если в обществе, региональном, муниципальном сообществе

имеются сложности с удовлетворением потребности в питании, то уверенно можно говорить о риске снижения продовольственной безопасности и в целом о риске снижения качества жизни населения.

Под риском снижения качества жизни предлагается понимать возможную опасность снижения уровня и ухудшения условий жизни людей под влиянием неопределенности внешней среды и / или различных видов деятельности человеческого общества. Трудно в данном случае не согласиться с мнением Е. В. Щекотина, считающего, что «качество жизни – это совокупность возможных рисков, угроз и опасностей, характеризующая условия человеческой жизнедеятельности, реализация которых может привести к реальным неблагоприятным последствиям для общества и человека» [39].

Продовольственный риск снижения качества жизни (совместно с экономическим, энергетическим и риском социально-трудовой сферы) относится к риску снижения уровня жизни населения, который вместе с риском ухудшения условий жизни (включает риски личной безопасности, ухудшения жилищных условий, экологический, в сферах здравоохранения и образования, культурно-досуговой сфере, политический, информационный) агрегируется в общий показатель риска снижения качества жизни. Под продовольственным риском предлагается понимать опасность отсутствия продуктов питания в достаточном количестве и свободного доступа к ним, снижения покупательской способности населения.

Уровень продовольственного риска в регионе (как и всех других видов угроз) определяется через среднее арифметическое значение относительных отклонений региональных показателей по всем индикаторам данного вида риска от соответствующих общефедеральных показателей. В случае с продовольственным риском для оценки использовали следующие индикаторы: потребление на душу населения мяса и мясопродуктов, молока и молочных продуктов, картофеля, овощей и бахчевых культур, яиц, сахара, растительного масла, хлебных продуктов, фруктов и ягод, а также индекс потребительских цен на продовольственные товары.

Информационной базой для анализа уровня потребления населением продуктов питания и индекса пот-

ребительских цен послужили данные Росстата. Рациональные нормы потребления основных продуктов питания утверждаются Министерством здравоохранения РФ и публикуются на сайте ведомства. Сопоставление норм с фактическими данными по стране и регионам позволяет достаточно объективно оценивать не только количественные, но и качественные характеристики объемов потребления пищевых продуктов. Нормы потребления периодически пересматриваются и корректируются. В настоящем исследовании сравнение уровня потребления продуктов питания с нормативными значениями играет дополнительную роль.

Теоретическая часть исследования включала обзор научных источников и нормативных документов, системный подход, дедукцию и индукцию. Эмпирическое исследование построено на анализе статистических данных уровня потребления девяти основных продуктов питания и индекса потребительских цен на продовольственные товары за 2012–2022 гг. (для анализа взяты четные годы), сравнении кузбасских данных с федеральными, определении степени их отклонения, которая в усредненном варианте отражает состояние продовольственного риска снижения качества жизни.

### Результаты и их обсуждение

Рассмотрим нормативные и реальные показатели потребления базовых продуктов питания, а также индекс потребительских цен на продовольственные товары за 10 лет с двухгодичной периодичностью, сравнивая кузбасские данные с общероссийскими.

В таблице 1 представлены показатели, отражающие потребление мясных продуктов. Нормы потребления мяса и мясных продуктов в России постепенно растут (отметим, что более половины рекомендуемых мясных продуктов приходится на мясо птицы), как и фактическое их потребление в стране. При этом россияне едят мяса немного больше (на 3–6 %), чем советуют специалисты. Однако в Кузбассе ситуация несколько иная – до 2016 г. включительно жители региона потребляли мяса больше нормы, но затем этот показатель стал ниже нормативных значений (на 4–5 %). В итоге отставание областного показателя от федерального увеличилось с 1,4 до 7,7 %.

Таблица 1. Потребление мяса и мясопродуктов на душу населения

Table 1. Consumption of meat and meat products per capita

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	70	70	70	73	73	76
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	74 (105,7)	74 (105,7)	74 (105,7)	75 (102,7)	76 (104,1)	78 (102,6)
Кузбасс	73 (104,3)	73 (104,3)	73 (104,3)	70 (95,9)	70 (95,9)	72 (94,7)
Кузбасс / Россия, % отклонения	-1,4	-1,4	-1,4	-6,7	-7,9	-7,7

Потребление молока и молочных продуктов в пересчете на молоко должно составлять 340 кг в год на человека (рост за 10 лет на 20 кг). Питьевые продукты (молоко, кефир, йогурт) составляют 110 кг, а остальные (сметана, масло животное, творог, сыр) – 33 кг. Фактически россияне употребляют более 241 кг (71 %) молока и молочных продуктов, а кузбассовцы – 203 кг (60 %) (табл. 2).

В начале анализируемого периода молочные продукты были более востребованы у населения страны и в большей мере соответствовали норме, но затем случился заметный спад их потребления (особенно в 2016–2018 гг.), после которого наметился подъем в абсолютном выражении. В Кузбассе спад потребления молока и молокопродуктов был более заметным, чем в стране, и продолжается до сих пор. В итоге в 2022 г. отставание региональных значений от федеральных достигло 16 %, увеличившись за 10 лет почти вдвое.

Норма потребления картофеля за 10 лет сократилась на 5 кг и в настоящее время составляет 90 кг в год (табл. 3). Россияне с каждым годом едят картофеля все меньше – за анализируемый период снижение составило 13 кг, и в последние годы картофеля съедается на 7 % меньше нормы. В Кемеровской области картофель всегда был более популярным продуктом, чем в целом по стране; его потребление ни разу не опускалось ниже нормы и, по последним данным, составляет 96 кг в год на человека, что выше нормы на 7 %. В итоге потребление картофеля в Кузбассе

всегда было выше среднероссийского показателя; в 2022 г. соответствующая разница превысила 14 %.

И россияне, и кузбассовцы серьезно отстают от норм потребления овощей и продовольственных бахчевых культур, которые за десятилетие выросли с 120 до 140 кг в год (табл. 4).

Россияне до повышения нормы не добивали примерно 15 % по данному виду продовольствия, а после повышения – около 25 %. В Кузбассе потребление овощей и бахчевых составляло менее 60 % от рационального уровня, но повышение нормы отразилось не так серьезно на реальном употреблении продуктов. Кузбассовцы сократили в последние годы отставание от федеральных показателей, но разрыв остается очень большим – 27 %.

Достаточно стабильная и благоприятная ситуация складывается в стране и в кузбасском регионе по потреблению яиц. По норме человек должен употребить в пищу в течение года 270 штук (ранее 260), по факту в 2022 г. жители съели по 288 яиц, что на 7 % превышает норму (табл. 5). В предшествующие годы и на федеральном, и на региональном уровнях было превышение нормы, но в Кемеровской области в меньшей степени.

Норма потребления сахара – единственный показатель, который за 10 лет не изменил своей величины (24 кг в год на человека). И именно по этому продукту зафиксировано самое большое превышение нормы, особенно на уровне страны (табл. 6). Россияне в последние годы потребляют сахара больше нормы

Таблица 2. Потребление молока и молочных продуктов на душу населения

Table 2. Consumption of milk and dairy products per capita

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	320	320	320	325	325	340
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	246 (76,9)	239 (74,7)	231 (72,2)	229 (70,5)	240 (73,8)	241 (70,9)
Кузбасс	225 (70,3)	209 (65,3)	205 (64,1)	200 (61,5)	203 (62,5)	203 (59,7)
Кузбасс / Россия, % отклонения	-8,5	-12,6	-11,3	-12,7	-15,4	-15,8

Таблица 3. Потребление картофеля на душу населения

Table 3. Potato consumption per capita

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	95	95	95	90	90	90
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	97 (102,1)	93 (97,9)	90 (94,7)	89 (98,9)	86 (95,6)	84 (93,3)
Кузбасс	104 (109,5)	95 (100,0)	95 (100,0)	101 (112,2)	101 (112,2)	96 (106,7)
Кузбасс / Россия, % отклонения	7,2	2,2	5,6	13,5	17,4	14,3

Таблица 4. Потребление овощей и продовольственных бахчевых культур на душу населения

Table 4. Consumption of vegetables and melons per capita

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	120	120	120	140	140	140
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	103 (85,8)	102 (85,0)	102 (85,0)	107 (76,4)	107 (76,4)	104 (74,3)
Кузбасс	70 (58,3)	70 (58,3)	71 (59,2)	77 (55,0)	80 (57,1)	76 (54,3)
Кузбасс / Россия, % отклонения	-32,0	-31,4	-30,4	-28,0	-25,2	-26,9

Таблица 5. Потребление яиц на душу населения

Table 5. Egg consumption per capita

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	260	260	260	270	270	270
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	276 (106,2)	271 (104,2)	277 (106,5)	284 (105,2)	283 (104,8)	288 (106,7)
Кузбасс	262 (100,8)	270 (103,8)	275 (105,8)	275 (101,9)	281 (104,1)	288 (106,7)
Кузбасс / Россия, % отклонения	-5,1	-0,4	-0,7	-3,2	-0,7	0,0

Таблица 6. Потребление сахара на душу населения

Table 6. Sugar consumption per capita

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	24	24	24	24	24	24
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	40 (166,7)	40 (166,7)	39 (162,5)	39 (162,5)	39 (162,5)	39 (162,5)
Кузбасс	33 (137,5)	33 (137,5)	33 (137,5)	32 (133,3)	32 (133,3)	32 (133,3)
Кузбасс / Россия, % отклонения	-17,5	-17,5	-15,4	-17,9	-17,9	-17,9

Таблица 7. Потребление масла растительного

Table 7. Oil consumption

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	10	10	10	12	12	12
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	13,7 (137,0)	13,8 (138,0)	13,7 (137,0)	14,0 (116,7)	13,9 (115,8)	13,8 (115,0)
Кузбасс	10,3 (103,0)	10,1 (101,0)	10,2 (102,0)	10,0 (83,3)	10,4 (86,7)	10,3 (85,8)
Кузбасс / Россия, % отклонения	-24,8	-26,8	-25,5	-28,6	-25,2	-25,4

почти на две трети, кузбассовцы – на треть (в начале периода превышение было еще больше). Отставание Кемеровской области от федерального уровня составляет около 18 %.

Норма потребления растительного масла составляет 12 кг в год на человека, увеличившись после 2016 г. на 2 кг. Динамика показателей фактического использования данного продукта малозаметна (табл. 7).

На уровне страны реальное потребление было и остается выше нормы. В Кузбассе в 2012–2016 гг. фактическое потребление растительного масла незначительно превышало норму (на 1–3 %). Начиная с 2018 г. потребление этого продукта кузбассовцами значительно снизилось (на 13–17 %) в сравнении с рекомендуемой нормой. В результате отставание потребления растительного масла в Кемеровской области от среднероссийского уровня составляет около 25 %.

Исходя из данных таблицы 8 видно, что фактическое потребление хлебных продуктов за весь анализируемый период превышает рекомендуемую норму. При норме потребления хлебных продуктов (хлеб и макаронные изделия в пересчете на муку, крупы, бобовые) 95–96 кг на человека в год россияне съели 119 кг в 2012 г., 113 кг – в 2022 г. (125 до 118 % от рекомендуемого объема соответственно). В Кузбассе динамика потребления хлебных продуктов в анализируемый период выражена более рельефно: 124 кг – в 2012 г., 109 кг – 2022 г. (131 и 114 % от рекомендуемого объема соответственно). Сравнение региональных данных с федеральными показывает, что сначала Кемеровская область опережала Россию по потреблению хлебных продуктов, затем стала отставать.

В рационе как россиян, так и кузбассовцев присутствует мало фруктов и ягод (табл. 9). При актуальной норме 100 кг в год на человека (до 2017 г. – 90 кг) среднестатистический житель страны употребляет 63 кг свежих фруктов и ягод (63 % от нормативного значения), Кемеровской области – всего 44 кг (44 %).

За 10 лет фактические показатели менялись незначительно, потребление фруктов и ягод в России увеличилось на 3 кг, а в Кузбассе уменьшилось на 4 кг. Зафиксировано достаточно серьезное отставание региональных показателей от федеральных: от 20 % в начале анализируемого периода до 30 % – в конце.

Последний индикатор продовольственного риска – индекс потребительских цен на продовольственные товары – содержательно отличается от предыдущих и имеет противоположный от них знак (в случае с потреблением продуктов питания зависимость на степень риска обратная: чем меньше люди потребляют тот или иной пищевой продукт, тем больше риск; у индекса потребительских цен зависимость прямая: чем выше показатель, тем выше риск снижения качества жизни). Данные таблицы 10 свидетельствуют, что цены на потребительские товары неуклонно растут как в Кузбассе, так и в России в целом. Особенно высоким был их прирост в 2024 г. – на 15 %. Близким является и российский показатель в 2022 г. – 14 %. В Кемеровской области цены на продукты питания растут медленнее (за исключением 2012 г.), что уменьшает общий показатель продовольственного риска снижения качества жизни на региональном уровне.

Проведя анализ данных по уровню потребления ряда базовых продуктов питания и изменения цены на продовольственные товары, обобщим представленные показатели и рассчитаем степень продовольственного риска (рис.).

Таблица 8. Потребление хлебных продуктов

Table 8. Bakery consumption

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	95	95	95	96	96	96
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	119 (125,3)	118 (124,2)	117 (123,2)	116 (120,8)	116 (120,8)	113 (117,7)
Кузбасс	124 (130,5)	120 (126,3)	117 (123,2)	113 (117,7)	112 (116,7)	109 (113,5)
Кузбасс / Россия, % отклонения	4,2	1,7	0,0	-2,6	-3,4	-3,5

Таблица 9. Потребление фруктов и ягод

Table 9. Consumption of fruits and berries

Показатель	Годы					
	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Рекомендуемая норма, кг в год	90	90	90	100	100	100
Фактическое потребление, кг в год (% от рекомендуемой нормы)						
Россия	60 (66,7)	63 (70,0)	60 (66,7)	61 (61,0)	61 (61,0)	63 (63,0)
Кузбасс	48 (53,3)	49 (54,4)	45 (50,0)	44 (44,0)	46 (46,0)	44 (44,0)
Кузбасс / Россия, % отклонения	-20,0	-22,2	-25,0	-27,9	-24,6	-30,2

Таблица 10. Индекс потребительских цен на продовольственные товары, %

Table 10. Consumer price index for food products, %

Показатель	2012	2014	2016	2018	2020	2022
Россия	107,5	115,4	104,6	104,7	106,7	113,8
Кузбасс	108,4	115,1	104,8	104,2	105,7	108,9
Кузбасс / Россия, % отклонения	0,8	-0,3	0,2	-0,5	-0,9	-4,3

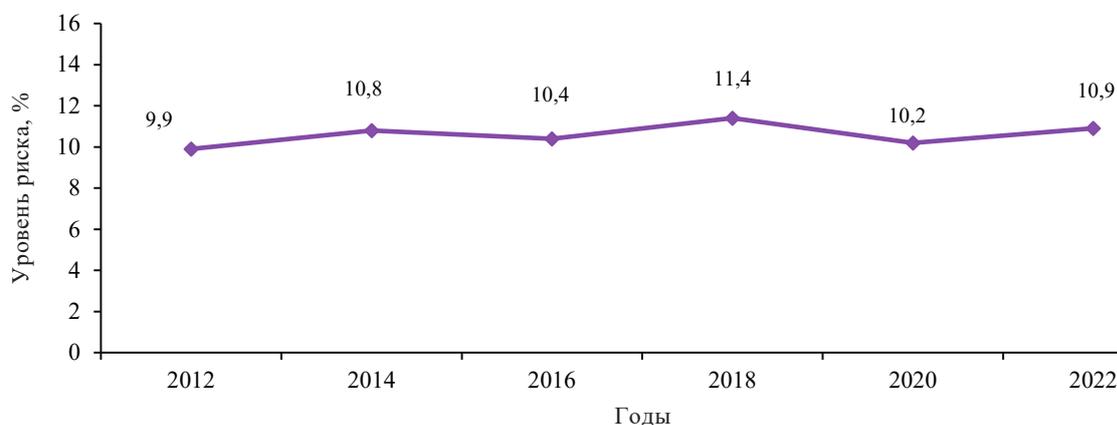


Рисунок. Продовольственный риск снижения качества жизни в Кемеровской области – Кузбассе

Figure. Food risk in the Kemerovo region

Показатель продовольственного риска снижения качества жизни за анализируемое десятилетие колеблется в пределах 10–11 %, что говорит о достаточно стабильном отставании Кузбасса от среднероссийского уровня по доступности продуктов питания, прежде всего в физическом выражении. Региону не удастся преодолеть серьезный дефицит потребления продуктов питания, особенно растительного происхождения – овощей и бахчевых культур, ягод и фруктов, растительного масла.

Методика расчета продовольственного риска носит несколько упрощенный характер, т. к. не учитывает многие качественные характеристики, такие как калорийность питания, степень полезности тех или иных продуктов, влияние на здоровье человека превышения рекомендуемых норм потребления или их недобора. Но данное упрощение имеет свои объяснения: во-первых, учет большого числа разноплановых индикаторов серьезно усложняет поиск данных, расчет агрегатных показателей, существуют разные мнения экспертов, например, о полезности или опасности одних и тех же продуктов. Во-вторых, на качество жизни влияют не только продовольственные, но и другие виды рисков, которые изучаются авторами исследования, а это обуславливает необходимость использования единого подхода к оценке рисков, его универсализации. Предложенный инструмент для оценки продовольственного риска легко масштабируется как на другие виды рисков, так и на другие территориальные объекты изучения.

## Выводы

Сравнительный анализ данных потребления девяти основных продуктов питания между региональным и федеральным уровнями в динамике за десятилетие показал, что по пяти продуктам Кемеровская область – Кузбасс стабильно отстает от среднероссийских показателей. Особенно существенно отставание по таким видам продовольствия, как овощи и бахчевые культуры; масло растительное; фрукты и ягоды (по данным 2022 г., на 25–30 %); немного меньше – по потреблению молочных продуктов и сахара (на 16–17 %). Потребление мяса и мясопродуктов в Кемеровской области также ниже среднероссийского показателя, но дельта не так существенна (в 2022 г. составляла 8 %), а в начале анализируемого периода была минимальной (более 1 %). Можно признать примерно равным федеральный и региональный уровни потребления еще двух видов продуктов – хлебных и яиц (разница по годам не превышает 5 %). И лишь по одному продукту – картофелю – Кузбасс во все годы опережал Россию (на 2–17 %). Потребительские цены на продукты питания в Кузбассе в последние годы росли более медленными темпами, чем в целом по стране.

Сопоставление фактического потребления продуктов питания и рекомендуемой нормы в Кузбассе демонстрирует серьезный и долговременный недобор в рационе питания свежих фруктов и ягод (в 2022 г. 44 % от нормы), овощей и бахчевых культур (54 %), молока и молочных продуктов (60 %). В последние

годы кузбассовцы потребляли растительное масло, мясо и мясные продукты в количествах ниже рекомендуемых. При этом недостаток данных продуктов в определенной степени компенсируется картофелем, яйцами, хлебом и хлебными продуктами, а также сахаром.

Расчет среднего значения отклонений региональных показателей от федеральных позволил определить уровень продовольственного риска снижения качества жизни, который в течение 10 лет находится в пределах 10–11 %. Чтобы снизить этот риск, предстоит большая и кропотливая работа по разным направлениям деятельности – от пропаганды здорового питания до роста производства собственной сельскохозяйственной продукции; от совершенствования торговой логистики по конкретным группам товаров до оптимизации системы регионального управления продовольственным обеспечением населения в целом.

#### **Критерии авторства**

Все авторы внесли равный вклад в получение экспериментальных данных и принимали участие в обработке, анализе и обобщении результатов исследования, а также в оформлении статьи.

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### **Contribution**

All authors have contributed equally to the study and are equally responsible for the information published in this article.

#### **Conflict of interest**

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

### **References/Список литературы**

1. Aivazian S, Mikhail A, Alexander K. Integral indicator of quality for life conditions. *Digital Economy*. 2019;(1):43–56. (In Russ.). [Айвазян С. А., Афанасьев М. Ю., Кудров А. В. Интегральный индикатор качества условий жизни // Цифровая экономика. 2019. № 1. С. 43–56.]. <https://elibrary.ru/ZSELNZ>
2. Bobkov VN, Odintsova EV. Low level and quality of life among economically active population: identification criteria and assessment of occurrence. *Economic and Social Changes: Facts, Trends, Forecast*. 2020;13(5):168–181. (In Russ.). <https://doi.org/10.15838/esc.2020.5.71.10>; <https://elibrary.ru/XAVDSD>
3. Golovin AA. Critical analysis of methods for measuring and monitoring of the population life quality. *Upravlenie*. 2021;(4):30–42. (In Russ.). <https://doi.org/10.26425/2309-3633-2021-9-4-30-42>; <https://elibrary.ru/WEJXYA>
4. Zubets AN. Russian and international approaches to quality-of-life assessment. Moscow: Financial University under the Government of the Russian Federation; 2020. 112 p. (In Russ.). [Зубец А. Н. Российские и международные подходы к измерению качества жизни. М.: Финансовый университет при Правительстве РФ, 2020. 112 с.]
5. Akulov AO, Babina SI, Belchik TA, Gryaznova NL, Donova IV, Egorova NM, *et al.* Assessing the socio-economic state of the region and the implementation of its development strategy. Kemerovo: Kemerovo State University; 2021. 355 p. (In Russ.). [Оценка социально-экономического состояния региона и реализации стратегии его развития / А. О. Акулов [и др.] // Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2021. 355 с.]. <https://elibrary.ru/WBHYEF>
6. Mikhailova MV. Quality of life of the population as a social dominant of state and municipal policy. St. Petersburg: Saint Petersburg State University of Economics; 2020. 133 p. (In Russ.). [Михайлова М. В. Качество жизни населения как социальная доминанта государственной и муниципальной политики. СПб.: СПбГЭУ, 2020. 133 с.]. <https://elibrary.ru/MSORNO>
7. Kosinsky PD, Kharitonov AV. Interrelation of quality of food and quality of life population: regional aspect. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2017;(7):130–133. (In Russ.). [Косинский П. Д., Харитонов А. В. Взаимосвязь качества питания и качества жизни населения: региональный аспект // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017. № 7. С. 130–133.]. <https://elibrary.ru/ZBDLJP>
8. Rashid FN, Sesabo JK, Lihawa RM, Mkuna E. Determinants of household food expenditure in Tanzania: implications on food security. *Agriculture and Food Security*. 2024;13:13. <https://doi.org/10.1186/s40066-023-00462-0>
9. Mann S, Loginova D. Distinguishing inter- and pan generational food trends. *Agricultural and Food Economics*. 2023;11:10. <https://doi.org/10.1186/s40100-023-00252-z>
10. Khng K, Chang C-C, Hsu S-H. Implications of food and nutrition security on household food expenditure: the case of Malaysia. *Agric and Food Security*. 2022;11:30. <https://doi.org/10.1186/s40066-022-00367-4>
11. Manikas I, Ali BM, Sundarakani B. A systematic literature review of indicators measuring food security. *Agric and Food Security*. 2023;12:10. <https://doi.org/10.1186/s40066-023-00415-7>
12. Wang X, Cui R, Tian X, Qian J. The Belt and Road initiative and food consumption in countries along the route. *Agribusiness*. 2023;39(1):1624–1646. <https://doi.org/10.1002/agr.21852>
13. Elagina AS. Dynamics of food consumption in the Russian Federation. *Economics: Yesterday, Today And Tomorrow*. 2023;13(1-2):305–312. (In Russ.). <https://doi.org/10.34670/AR.2023.53.94.001>; <https://elibrary.ru/NCRZHV>

14. Stanchin IM. Food consumption in Russia over a 100-year period. *Territory of Science*. 2014;(6):161–168. (In Russ.). [Станчин И. М. Потребление продовольствия в России в динамике 100-летнего периода // Территория науки. 2014. № 6. С. 161–168.] <https://elibrary.ru/TJDJWH>
15. Dolgova IE. Studying the experience of forming the consumer basket of the population. *Innovative, Educational, Natural and Social Sciences*. 2023;3(24):246–250. (In Russ.). <https://doi.org/10.5281/zenodo.10542049>
16. Zhelezovskaya LA. Agrarian sector of Russia: challenges and prospects of growth. *Era of Science*. 2019;(17):32–37. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/2409-3203-2018-11708>; <https://elibrary.ru/ZAQKZV>
17. Safonov AY. Food safety in agriculture: consumption of main food products and import substitution. *Moscow Economic Journal*. 2019;(9):21. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/2413-046X-2019-19029>; <https://elibrary.ru/GGDJGW>
18. Khramtsova TG, Khramtsova OO. Analysis of food consumption in the context of food security. *Vestnik NSUEM*. 2017;(3):249–257. (In Russ.). [Храмцова Т. Г., Храмцова О. О. Анализ потребления населением продуктов питания в контексте обеспечения продовольственной безопасности // Вестник НГУЭУ. 2017. № 3. С. 249–257.] <https://elibrary.ru/ZPCZQL>
19. Kazantseva EG, Lyamkin II. Micro-Ingredient Markets and Their Impact on the Sustainability of Food Systems. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(1):202–216. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2424>; <https://elibrary.ru/HOCFYJ>
20. Maksimova-Kulieva EA. Household food consumption and Russia's food independence. *Bulletin of the Altai Academy of Economics and Law*. 2022;(5-2):206–212. (In Russ.). <https://doi.org/10.17513/vaael.2198>; <https://elibrary.ru/LQCOAU>
21. Bogachev AI, Dorofeeva LN. The state of food security, consumption of basic foods and food quality in Russia. *Bulletin NGIEI*. 2023;(80):86–104. (In Russ.). <https://doi.org/10.24412/2227-9407-2023-8-86-104>; <https://elibrary.ru/NOTWSE>
22. Vaskin VF, Korosteleva ON. Food consumption and composition of expenditures for food of residents of the Bryansk region. *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*. 2020;(3):47–54. (In Russ.). [Васькин В. Ф., Коростелева О. Н. Потребление продуктов питания и состав расходов на продовольствие жителей Брянской области // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2020. № 3. С. 47–54.] <https://elibrary.ru/KRBIAO>
23. Chernova S. Impact of population income on food consumption in the Siberian Federal District. *AIC: Economics, Management*. 2021;(6):49–54. (In Russ.). <https://doi.org/10.33305/216-49>; <https://elibrary.ru/XVKKMB>
24. Shkiotov SV, Markin MI. The impact of real disposable cash income of the population on the economic availability of food in Russia. *Theoretical Economics*. 2021;(6):119–125. (In Russ.). [https://doi.org/10.52957/22213260\\_2021\\_6\\_119](https://doi.org/10.52957/22213260_2021_6_119); <https://elibrary.ru/DRBDCK>
25. Sculskaya LV, Shirokova TK. Some of the aspects of modern food policy. *Economy and Business: Theory and Practice*. 2019;(2):123–132. (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/2411-0450-2019-10379>; <https://elibrary.ru/YZCTYT>
26. Lisitsyn AB, Chernukha IM, Nikitina MA. Russian methodology for designing multicomponent foods in retrospect. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(1):2–11. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-2-11>; <https://elibrary.ru/MOLNCR>
27. Bandurin AP. Rational and irrational in social regulation of production and consumption food products. *Humanities, Social-Economic and Social Sciences*. 2022;(11-1):25–28. <https://doi.org/10.23672/f5462-3511-5802-u>; <https://elibrary.ru/CWRBNZ>
28. Grechushkina NA. Public policy measures to manage nutrition-related health risks. *City-Healthcare*. 2022;3(1):65–72. (In Russ.). <https://doi.org/10.47619/2713-2617.zm.2022.v3i1;65-72>; <https://elibrary.ru/SHBIAI>
29. Gruzdeva VV, Igoshin AN. Some aspects of food consumption in the region. *Bulletin NGIEI*. 2017;(9):110–118. (In Russ.). [Груздева В. В., Игошин А. Н. Некоторые аспекты потребления продуктов питания в регионе // Вестник НГИЭИ. 2017. № 9. С. 110–118.] <https://elibrary.ru/ZJTXGH>
30. Kremlev ND. Assessment of the region's population adaptation to food consumption norms. *Ars Administrandi*. 2022;14(1):66–81. (In Russ.). <https://doi.org/10.17072/2218-9173-2022-1-66-81>; <https://elibrary.ru/BFINWC>
31. Sergienko AM. Changes in food consumption by the population of the altai territory across different stages of economic development: a methodological analysis. *Economics Profession Business*. 2023;(1):90–100. (In Russ.). <https://doi.org/10.14258/epb202310>; <https://elibrary.ru/MCBJMQ>
32. Alikperova NV, Yarasheva AV. Food consumption: regional differentiation. *Regional and Sectoral Economy*. 2023;(8):65–74. (In Russ.). <https://doi.org/10.26726/1812-7096-2023-8-65-74>; <https://elibrary.ru/XEWRBI>
33. Rogacheva OA. Dynamics of consumption of basic foodstuffs in the Irkutsk region. *System Analysis and Mathematical Modeling*. 2022;4(2):152–160. (In Russ.). [https://doi.org/10.17150/2713-1734.2022.4\(2\).152-160](https://doi.org/10.17150/2713-1734.2022.4(2).152-160); <https://elibrary.ru/TFUZYV>
34. Sekacheva VM, Izhmulkina EA. Current trends and forecasting of food security of Kemerovo region. *Siberian Financial School*. 2012;(1):25–33. (In Russ.). [Секачева В. М., Ижмулкина Е. А. Современные тенденции и прогнозирование продовольственного обеспечения Кемеровской области // Сибирская финансовая школа. 2012. № 1. С. 25–33.] <https://elibrary.ru/OXKMQT>

35. Kharitonov AV. The regional food market in a context ensuring food security. Management of economic systems: Digital Scientific Journal. 2019;(5):6. (In Russ.). [Харитонов А. В. Региональный продовольственный рынок в контексте обеспечения продовольственной безопасности // Управление экономическими системами: электронный научный журнал. 2019. № 5. С. 6.]. <https://elibrary.ru/BDAAGZ>
36. Bondareva GS, Bondarev NS. Providing the population of Siberia with food: theory and methodology. Kemerovo: Kuzbass State Agricultural University; 2019. 315 p. (In Russ.). [Бондарева Г. С., Бондарев Н. С. Обеспечение населения регионов Сибири продовольствием: теория и методология. Кемерово: Кузбасская ГСХА, 2019. 315 с.]
37. Izhmulkina EA, Bondarev NS, Bondareva GS. Food supply forecasting in the Kemerovo region. Reelvant issues of storage and processing of agricultural raw materials. Kemerovo: Kuzbass State Agricultural University; 2020. pp. 5–18. (In Russ.). [Ижмулкина Е. А., Бондарев Н. С., Бондарева Г. С. Прогнозирование продовольственной базы региона на примере Кемеровской области // Актуальные проблемы хранения и переработки сельскохозяйственного сырья. Кемерово: Кузбасская ГСХА, 2020. С. 5–18.]. <https://elibrary.ru/ODJNKP>
38. Bondareva GS. Research methodology for socio-economic processes in food provision. Kemerovo: Kuzbass State Agricultural University; 2022. 127 p. (In Russ.). [Бондарева Г. С. Методология исследования социально-экономических процессов в обеспечении населения продовольствием. Кемерово: Кузбасская ГСХА, 2022. 127 с.]. <https://elibrary.ru/GEGCZX>
39. Shchekotin YeV. Issue of evaluation of quality of life in conditions of unstable socium. Vestnik NSUEM. 2013;(1): 151–161. (In Russ.). [Щекотин Е. В. Проблема оценки качества жизни в условиях неустойчивого социума // Вестник НГУЭУ. 2013. № 1. С. 151–161.]. <https://elibrary.ru/PYCIIR>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2550>  
<https://elibrary.ru/YDRSHS>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Влияние обогащенных рационов на состав и функциональный профиль микробиома рубца баранчиков



Т. М. Гиро<sup>1,\*</sup>, Л. А. Ильина<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева<sup>ROR</sup>, Москва, Россия

<sup>2</sup> ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный аграрный университет<sup>ROR</sup>, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию: 02.08.2024

Принята после рецензирования: 23.08.2024

Принята к публикации: 09.09.2024

\*Т. М. Гиро: [girotm@sgau.ru](mailto:girotm@sgau.ru),

<https://orcid.org/0000-0003-3039-1324>

Л. А. Ильина: <https://orcid.org/0000-0003-2789-4844>

© Т. М. Гиро, Л. А. Ильина, 2024



### Аннотация.

Микробиота пищеварительного тракта жвачных животных представляет собой сложную экологическую систему, ведущая роль которой состоит в ферментации компонентов кормов и защите организма от колонизации условно-патогенной и патогенной микрофлорой. Взаимодействие микробиоты с организмом-хозяином на фоне присутствия в рационах различных нутриентов усложняет понимание их влияния на пищеварительные процессы, иммунитет и продуктивность животных. Цель исследования – изучение с применением метода NGS-секвенирования состава и функционального профиля микробных сообществ рубца баранчиков эдильбаевской породы, выращенных с использованием рационов, обогащенных органическими добавками на основе эссенциальных микроэлементов.

Объектом исследования было рубцовое содержимое 7-месячных баранчиков эдильбаевской породы, получавших в составе рациона кормовые добавки на основе микроэлементов Йоддар-Zn и ДАФС-25. Для эксперимента было сформировано 4 группы животных: контрольная (ОР), I опытная (ОР + Йоддар-Zn), II опытная (ОР + ДАФС-25), III опытная (ОР + Йоддар-Zn + ДАФС-25). Состав и функциональный профиль микробиома рубца баранчиков изучали с применением современного молекулярно-генетического метода NGS-секвенирование. Биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Qiime2 ver. 2020.8. Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартной методике.

Результаты эксперимента свидетельствуют о положительном влиянии использованных в рационах кормовых добавок на показатели роста и развития баранчиков. Наибольшие показатели живой массы получены у животных III опытной группы, в рацион которых включали кормовые добавки Йоддар-Zn и ДАФС-25. В составе микробиома происходило изменение соотношения бактерий фил *Firmicutes: Bacteroidetes*, что говорит о потенциальном смещении метаболических процессов в сторону повышения соотношения летучих жирных кислот ацетат:пропионат. Наибольший сдвиг в микробиоме рубца отмечен у животных при использовании в рационах селен-содержащей добавки ДАФС-25 как отдельно, так и в сочетании с препаратом Йоддар-Zn. Применение кормовых добавок в рационах баранчиков не привело к повышению в рубце относительной численности бактерий *Proteobacteria*, *Mycoplasma*, *Escherichia-Shigella*, роль которых преимущественно связана с развитием различных воспалительных процессов у организма-хозяина. При использовании в рационе кормовых добавок в функциональном профиле микробиома рубца баранчиков наблюдалось усиление метаболических путей микробиоты рубца, связанных с углеводным и энергетическим обменом, а также синтезом витаминов и кофакторов. Кроме того, выявлены закономерности модификации микробиома, что свидетельствует о позитивном влиянии добавок на метаболические процессы в организме, являясь предпосылкой более полного усвоения кормовых ингредиентов, которые и послужили причиной повышения продуктивности животных опытных групп.

**Ключевые слова.** Баранчики, жвачные животные, рацион, кормовые добавки, эссенциальные микроэлементы, микробиоценоз, NGS-секвенирование

**Финансирование.** Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 19-76-10013-П «Разработка и внедрение технологии производства и хранения экологически безопасной баранины, обогащенной эссенциальными микроэлементами».

**Для цитирования:** Гиро Т. М., Ильина Л. А. Влияние обогащенных рационов на состав и функциональный профиль микробиома рубца баранчиков // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 848–871. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2550>

## Effect of Diet Supplements on Rumen Microbiome in Young Ram



Tatiana M. Giro<sup>1,\*</sup>, Larisa A. Ilina<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy<sup>ROR</sup>, Moscow, Russia

<sup>2</sup> LLC BIOTROF, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Saint-Petersburg State Agrarian University<sup>ROR</sup>, Pushkin, St. Petersburg, Russia

Received: 02.08.2024

Revised: 23.08.2024

Accepted: 09.09.2024

\*Tatiana M. Giro: [girotm@sgau.ru](mailto:girotm@sgau.ru),

<https://orcid.org/0000-0003-3039-1324>

Larisa A. Ilina: <https://orcid.org/0000-0003-2789-4844>

© T.M. Giro, L.A. Ilina, 2024



### Abstract.

The gastrointestinal microbiome of ruminants is a complex ecological system. It ferments feed components and protects the body from opportunistic and pathogenic microflora. The interaction between the microbiota and the host organism depends on the diet, which complicates the scientific understanding of their impact on digestive processes, immunity, and yield. The article describes the composition and functional profile of microbiome in the rumen of young Edilbay rams fed with organic additives based on essential microelements.

The samples were obtained from seven-month-old Edilbay rams, which received Ioddar-Zn and DAFS-25 feed additives. The study involved four groups of animals: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25). The composition and functional profile of the microbiome were studied using the NGS sequencing. The bioinformatics data analysis involved Qiime2 ver. 2020.8 and standard statistical methods.

The feed additives had a positive effect on the growth and development of the rams. The highest live weight indicators belonged to experimental group III, which received Yoddar-Zn and DAFS-25. The ratio of Firmicutes and Bacteroidetes phylum changed, indicating a potential shift in metabolic processes towards an increase in the ratio of volatile fatty acids (acetate / propionate). The greatest changes were observed in animals that consumed the selenium additive DAFS-25, both separately and with Ioddar-Zn. The additives did not increase the count of Proteobacteria, Mycoplasma, and Escherichia-Shigella, which are associated with inflammatory processes.

The feed additives affected the functional profile of rumen microbiome in young rams: they improved the carbohydrate and energy metabolism, as well as the synthesis of vitamins and cofactors. In addition, the research revealed some patterns of microbiome modification, which indicated a positive effect of the additives on metabolic processes, resulting in a more efficient digestion of feed ingredients and, eventually, in increased meat yield.

**Keywords.** Rams, ruminants, diet, feed additives, essential trace elements, microbiome, NGS sequencing

**Financing.** The research was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 19-76-10013-P: Production and storage of environmentally safe mutton fortified with essential trace elements.

**For citation:** Giro TM, Ilina LA. Effect of Diet Supplements on Rumen Microbiome in Young Ram. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):848–871. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2550>

### Введение

Ожидаемо, что в ближайшее 30-летие население мира увеличится до 9,7 млрд к 2050 г. (ООН, 2019 г.). При этом отмечаемый рост ВВП в развивающихся странах и урбанизация неизбежно направляют концепцию питания в сторону увеличения потребления белковых продуктов животного происхождения [1]. В связи с этим постепенно возрастает и спрос на продукцию животноводства для удовлетворения пище-

вых потребностей быстро растущего населения, среди которых одним из перспективных направлений является овцеводство [2].

Баранина отличается высокой пищевой ценностью и может использоваться в продуктах для здорового питания. Эффективным способом придания функциональных свойств мясным продуктам признана прижизненная модификация мясного сырья путем оптимизации кормовых рационов, обогащенных функциональными

ингредиентами. В настоящее время установлено, что на формирование качественных характеристик мяса влияет комплекс факторов [3, 4].

Тип питания, качество корма и наличие в нем достаточного количества необходимых минеральных веществ могут оказывать существенное влияние на формирование структуры и функциональный профиль микробного сообщества рубца жвачных. Микроорганизмы рубца жвачных выполняют важнейшие функции в организме, связанные с ферментацией растительных кормов до доступных животным соединений, таких как ЛЖК (летучие жирные кислоты – ацетат, пропионат, бутират и пр.), аммиак, липиды и др. Благодаря сложной анаэробной микробиоте, включающей бактерии, археи, грибы и инфузории, жвачные животные способны использовать растительную клетчатку в качестве источника энергии и питательных веществ. Микроорганизмы рубца, общее видовое разнообразие которых достигает нескольких тысяч, играют различную роль в переваривании соединений кормов и действуют при этом синергически, ферментируя структурные углеводы, белки и жиры растений в результате взаимообусловленных ферментативных процессов [5]. Поэтому доступность питательных веществ может изменять состав микробного сообщества рубца и связанные с ним функции, такие как деградация клетчатки и гидрирование жирных кислот [5]. На фоне высококонцентратных рационов в микробиоте рубца КРС преобладали бактерии с амилитической способностью *Prevotella ruminicola*, *Prevotella brevis*, *Prevotella bryantii* и *Prevotella albensis*, а на фоне повышенного количества грубых кормов – увеличивалось общее биоразнообразие микробиоты и количество целлюлозолитических видов [6, 7].

Преыдушие исследования подчеркнули существенное влияние состава рациона на усвоение кормов, что оказалось связанным с составом микробиома рубца у различных жвачных животных [6, 8]. В связи с этим в качестве кормовых добавок внимание исследователей привлекают некоторые природные вещества и соединения растительного происхождения с выраженными антимикробными свойствами. Действие данных препаратов основано на коррекции микробиома рубца, направленной на улучшение переваривания клетчатки, ингибирование избыточного выделения аммиака за счет частичного подавления протеолиза, снижение метанообразования и повышение продуктивности животных [9, 10]. Таким образом, стратегия коррекции рациона жвачных путем использования кормовых добавок позволяет снижать затраты на такие необходимые ресурсы, как корма, вакцины, лекарства и нежелательную экологическую нагрузку на окружающую среду [11].

Наличие и количество минералов в рационах жвачных может оказывать влияние на ферментацию кормов в рубце. Отмечалось, что добавление селена в рационы КРС приводило к модификации состава микробиома

рубца и соотношения ЛЖК [12]. По данным исследователей, введение в рационы минеральных добавок было связано с количеством в рубце продуцентов таких ЛЖК, как пропионат, изобутират и изовалерат [13, 14]. В других исследованиях отмечалось отсутствие эффекта или отрицательное влияние на ферментативные процессы в рубце, в частности, в ответ на добавление марганца и цинка в рационы животных. Реакция микробиома зависела от источника минералов [13, 15].

В последние годы пристальное внимание исследователей сосредоточено на изучении влияния таких микроэлементов, как цинк, селен, железо, на продуктивные качества животных. В частности, селен все чаще рассматривается как кормовая добавка для повышения усвояемости кормов и продуктивности животных [16, 17]. Выявлено, что применение селена эффективно для нормализации обмена веществ, повышения общей резистентности организма и продуктивности животных [18]. В целой серии исследований было установлено, что добавление цинка в рационы жвачных улучшает такие параметры, как потребление корма, эффективность его усвоения и среднесуточный прирост живой массы животных [18, 19]. Исследователями показано наличие корреляции указанных зоотехнических параметров выращивания животных, в частности прироста живой массы, с содержанием некоторых представителей рубцовой микробиоты [19].

Тем не менее на сегодняшний день многие аспекты влияния микроэлементов на здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных изучены недостаточно. В частности, не было получено достаточно сведений о механизмах влияния микроэлементов на организм хозяина и на микробиоту желудочно-кишечного тракта, особенно у жвачных животных.

Для более глубокого понимания процесса формирования качественных показателей баранины в рамках данного исследования был проведен высокопроизводительный молекулярно-генетический анализ методом NGS-секвенирования. Был изучен состав микробиоценоза содержимого рубца баранчиков, которые выращивались с добавлением эссенциальных микроэлементов в рацион. Метод NGS-секвенирования, основанный на анализе последовательностей гена 16S рРНК, представляет один из наиболее востребованных на сегодняшний день молекулярных методов для «миксных» исследований. Он позволяет детально охарактеризовать изменения в микробных сообществах таких сложных экосистем, как микробиом рубца жвачных, что позволяет по-новому взглянуть на структуру и функции этих сложных микробных сообществ при различных воздействиях [20].

Проведенные исследования позволили сделать важный шаг к пониманию процессов, происходящих в многокомпонентной матрице под названием «мясо», и оценить перспективы производства высококачественной баранины, обогащенной эссенциальными микроэлементами.

Цель исследования состояла в изучении с применением метода NGS-секвенирования состава и функционального профиля микробных сообществ рубца баранчиков эдильбаевской породы, выращенных с использованием рационов, обогащенных органическими добавками на основе эссенциальных микроэлементов. В задачи входило изучение вклада эссенциальных микроэлементов в составе рационов в формирование микробных сообществ рубца, а также оценка безопасности их применения при откорме баранчиков в промышленных условиях.

### Объекты и методы исследования

Для исследования был проведен научно-хозяйственный эксперимент на базе УПП «Экспериментальное животноводство» Краснокутского филиала Саратовского государственного аграрного университета им. Н. И. Вавилова в 2020–2021 гг. Для эксперимента при отъеме от овцематок методом параналогов было сформировано 4 опытные группы из 4-месячных баранчиков эдильбаевской породы, по 10 голов в каждой группе.

Основной рацион животных включал комбикорм ОК-81-2 («Госненский комбикормовый завод», Россия), предназначенный для молодняка коз и овец старше 4 месяцев. В рационах животных были использованы комплексные кормовые добавки, предназначенные для повышения питательной ценности кормов, восполнения дефицита макро- и микронутриентов со сбалансированным химическим составом и высокой биологической ценностью: Йоддар-Zn и ДАФС-25.

Кормовая добавка Йоддар-Zn (ТУ 10.91.10-253-10514645-2019) является источником цинка ( $12,5 \pm 1,25$  мкг/1000 мг кормовой добавки) и биодоступного йода в органической форме – 3 мг на 100 г (в т. ч. связанного йода  $33 \pm 3,3$  мкг на 1000 мг кормовой добавки) и кремния – не менее 1,0 %.

Добавка ДАФС-25 представляет собой органическое соединение – диацетофенонилселенид (ТУ 9337-001-26880895-96, свидетельство о гос. регистрации № ПВР 2.04.0185-96), массовая доля селена составляет не менее 0,04 мг на 100 г и кремния – не менее 0,75 %.

В таблице 1 представлена схема эксперимента. Рацион контрольной группы животных включал дополнительно к основному рациону – 300 г/гол. в сутки комбикорма, I опытной группы – основной рацион + 300 г/гол. в сутки комбикорма + 300 мг/гол.

в сутки Йоддар-Zn; II опытной группы – основной рацион + 300 г/гол. в сутки комбикорма + 0,5 мг/гол. в сутки ДАФС-25; III опытной группы – основной рацион + 300 г/гол. в сутки комбикорма + 300 мг/гол. в сутки Йоддар-Zn + 0,5 мг/гол. в сутки ДАФС-25.

Согласно ТУ 10.91.10-252-10514645-2019 и ТУ 10.91.10-253-10514645-2019 Поволжского НИИ производства и переработки мясомолочной продукции (г. Волгоград), совместно с добавками Йоддар-Zn и ДАФС-25 корм был дополнен препаратом Коретрон в количестве 1,0 % от массы корма и жмыхом тыквенным холодного прессования, представляющим белково-углеводный компонент в количестве 20,0 % от массы корма.

Состав тыквенного жмыха: сырой протеин – 22–37 %, сырой жир – 21,15 %, сырая клетчатка – 11,18 %, незаменимые аминокислоты (в том числе – до 3,28 % от общего белка), макро- и микроэлементы (селен – до 3 мг/кг), каротиноиды и витамин Е.

В ходе эксперимента оценивались показатели роста и развития животных посредством взвешиваний и учета основных измерений тела, начиная с начала эксперимента (в 4-месячном возрасте) и заканчивая его окончанием (в 7-месячном возрасте).

По завершении опыта (105 суток) и достижении животными возраста 7 мес. провели контрольный убой традиционным способом в условиях убойного пункта УПП «Экспериментальное животноводство» в соответствии с требованиями Технического регламента Таможенного Союза о безопасности мяса и мясной продукции ТР ТС 034/2013. Перед убоем все животные подвергались 24-часовой голодной выдержке.

Пробы содержимого рубца у контрольных и опытных групп баранчиков отбирали в стерильные контейнеры (Пан Эко, Россия) сразу после забоя животных, после чего был проведен анализ микробиального состава. Отбор образцов рубцового содержимого осуществляли с применением условий асептики. Хранение и транспортировку образцов осуществляли в специальных контейнерах при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Лабораторное исследование образцов методом NGS-секвенирования для анализа состава микробного сообщества рубца животных провели в условиях молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ». Для этого из образцов выделяли тотальную ДНК, используя набор Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Inc., Литва) согласно рекомендациям производителя. Конечную концентрацию тотальной ДНК в растворе измеряли на флуориметре Qubit (Invitrogen,

Таблица 1. Схема эксперимента

Table 1. Course of experiment

Группа	Контроль	I опытная	II опытная	III опытная
Рацион	Основной рацион	Основной рацион + Йоддар-Zn	Основной рацион + ДАФС-25	Основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25

Inc., США) с наборами Qubit dsDNA BR Assay Kit (In-vitrogen, Inc., США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Микробиом рубца оценивали методом NGS-секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США) с праймерами для V3-V4 региона 16S рРНК. Прямой праймер: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3', обратный праймер: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. Секвенирование проводили с использованием реагентов для подготовки библиотек Nextera® XT IndexKit (Illumina, Inc., США), для очистки ПЦР-продуктов Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., США) и для секвенирования MiSeq® ReagentKit v2 (500 cycle) (Illumina, Inc., США). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2½250 п.н.

Биоинформатический анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Qiime2 ver. 2020.8. После первоначального импорта последовательностей в формат Qiime2 парные строки прочтений выравнивали. Далее последовательности фильтровали по качеству с использованием настроек по умолчанию. Шумовые последовательности фильтровали методом Deblur, при этом использовали максимальную длину последовательности обрезки, равную 250 п.н. Для анализа таксономии использовали справочную базу данных Silva 138.

На основании таблицы оперативно-таксономических единиц с помощью плагинов программного пакета Qiime2 рассчитывали индексы  $\alpha$ -разнообразия и строили графики зависимости числа оперативно-таксономических единиц от числа прочтений.

Реконструкцию и прогнозирование функционального содержания метагенома, семейств генов, ферментов выполняли при помощи программного комплекса PICRUST2 (v.2.3.0). С программой работали

согласно рекомендованному сценарию, все настройки использовали по умолчанию. Для анализа метаболических путей и ферментов пользовались базой данных MetaCyc. Прогнозируемые профили метаболических путей MetaCyc оценивали по обилию ASV (Amplicon Sequence Variants).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартной методике, с помощью приложения Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., США) и пакета для статистического анализа данных StatPlus 2009 Professional 5.8.4 for Windows (StatSoft Inc., США) с использованием *t*-критерия Стьюдента для оценки достоверности различий между выборками в опыте и в контроле (Scheuer, 2013).

## Результаты и их обсуждение

**Влияние кормовых добавок на показатели роста и развития животных.** По результатам исследований установили положительное влияние всех используемых в рационах кормовых добавок на показатели роста и развития баранчиков. Результаты оценки динамики живой массы молодняка исследуемых животных отражены в таблице 2.

В начале эксперимента показатели живой массы 4-месячных баранчиков составили в контрольной группе – 31,16 ± 0,22 кг, в I группе – 31,27 ± 0,19 кг, во II группе – 31,46 ± 0,17 кг, в III группе – 31,68 ± 0,21 кг. В конце проведения эксперимента баранчики возрастом 7 месяцев имели среднюю живую массу в контрольной группе – 40,47 ± 0,31 кг, I опытной группы – 41,63 ± 0,35 кг, II – 43,52 ± 0,29 кг, III – 45,21 ± 0,37 кг. В период эксперимента подопытные животные не выбывали.

Животные I опытной группы, в состав рациона которых включали кормовую йодсодержащую добавку Йоддар-Zn, по показателю средней живой массы превышали контрольную группу на 2,79 %, что составляет 1,2 кг. Баранчики II группы, получавшие в составе рациона селенсодержащую добавку ДАФС-25, по живой

Таблица 2. Динамика живой массы эдильбаевских баранчиков

Table 2. Effect of additives on live weight of Edilbay rams

Показатель	Группа			
	Контрольная	I	II	III
При рождении				
Живая масса, кг	3,84 ± 0,03	3,89 ± 0,02	3,93 ± 0,02	3,98 ± 0,03
4 месяца				
Живая масса, кг	31,16 ± 0,22	31,27 ± 0,19	31,46 ± 0,17	31,68 ± 0,21
Абсолютный прирост, кг	27,32 ± 0,21	27,38 ± 0,33	25,53 ± 0,23	27,70 ± 0,30
Среднесуточный прирост, г	227,70 ± 0,33	228,20 ± 0,18	229,40 ± 0,16	230,80 ± 0,05
7 месяцев				
Живая масса, кг	40,47 ± 0,31	41,63 ± 0,35	43,52 ± 0,29	45,21 ± 0,37*
Абсолютный прирост, кг	3,10 ± 0,02	3,45 ± 0,05	4,01 ± 0,03	4,49 ± 0,06
Среднесуточный прирост, г	103,30 ± 0,36	115,00 ± 0,24*	133,70 ± 0,28*	149,70 ± 0,37*

Примечание: \* $p \leq 0,05$  по отношению к контрольной группе.

Note: \* $p \leq 0.05$  vs. control.

массе превышали показатели контрольной группы на 7,01 %, что составило 3,1 кг. Наибольшие показатели живой массы выявлены у баранчиков III опытной группы, в рационах которых включали обе исследуемые кормовые добавки – Йоддар-Zn и ДАФС-25. Их показатели живой массы превышали контрольные на 10,48 %, что составило 4,27 кг.

При анализе результатов среднесуточного прироста живой массы подопытных баранчиков в возрастной период 120–210 дней установлено, что данные показатели у I опытной группы превышают контрольную группу на 10,17; II – на 22,74 и III – на 31,00 %.

Показатели абсолютных приростов живой массы животных (табл. 2) продемонстрировали, что у баранчиков экспериментальных групп относительно контрольной группы в период от 120–210 дней превышают в I группе на 10,14; во II – на 22,69; в III – на 30,96 %.

В наблюдениях за состоянием экспериментальных животных установлено, что введение в рационы животных кормовых добавок приводит к нормализации обменных процессов в организме, регуляции пищеварительной деятельности, что способствует улучшению поедаемости кормов и, как следствие, повышению приростов живой массы.

Полученные результаты исследований согласуются с ранее выявленными закономерностями влияния кормовых добавок на основе йода, цинка и селена в рационах различных сельскохозяйственных животных.

Биологическая ценность йода, вследствие которой его часто используют в рационах животных [21], связана с включением его в биосинтез гормонов щитовидной железы – трийодтиронина (Т3) и тетраидтиронина / тироксина (Т4). У жвачных йод, поступающий в организм, легко всасывается (от 70 до 90 %) в рубце, сетке и сычуге (NRC, 2015), в тонком кишечнике, затем попадает в печень через воротную вену и далее в щитовидную железу, где его доля достигает 80 % [22]. Гормоны щитовидной железы способствуют усилению образования энергии и клеточного дыхания в организме, поэтому действие йода на организм связывают с его влиянием на энергетический обмен, мышечную функцию, рост, кровообращение, иммунную защиту и циклы фертильности [23]. Избыток йода, как и некоторых других микроэлементов, может вызывать токсический эффект у животных. Описаны случаи интоксикации организма человека и животных на фоне избытка йода в макроводорослях, которые использовались в их питании [24].

Исследования по влиянию йода на организм жвачных были выполнены на дойном поголовье КРС, тогда как действие на других жвачных, таких как овцы, практически отсутствует [25, 26]. В исследовании подтвердили позитивное влияние кормовой добавки Йоддар-Zn на показатели роста и развития баранчиков, что могло быть обусловлено биологическим действием данного препарата, включающего йод и цинк в органической форме, на организм. Интересно, что

ранее было показано, что при одновременном поступлении в организм животных с йодом органического цинка, являющегося ко-фактором супероксиддисмутаз, отсутствует рост количества супероксид радикалов, что и приводит к улучшению биосинтеза гормонов щитовидной железы.

Рассматривая пользу цинка для организма животных, в частности млекопитающих, необходимо отметить его участие в функционировании более 300 ферментов, особенно связанных с синтезом ДНК, процессах роста и деления клеток, формирования иммунитета [27, 28]. Недостаток или избыток цинка может вызывать токсический эффект в организме животных, прежде всего, связанный с нарушением работы иммунной системы организма [29]. У полигастричных животных, в отличие от моногастричных, на фоне субклинического дефицита цинка не снижается выработка антител или устойчивость к заболеваниям, а на фоне клинического – изменяется профиль сыровоточных лейкоцитов [30]. По современным представлениям, органические источники цинка (протеинат Zn, ZnAA и метионин Zn) более биодоступны, чем неорганические, которые наиболее часто используются в минеральных добавках для жвачных животных – ZnSO<sub>4</sub> и ZnO [31]. Результаты исследований подтверждают ранее полученные данные об улучшении показателей продуктивности жвачных животных при использовании в рационах органических источников цинка. Ранее исследователи в результате применения в рационах жвачных органического цинка по сравнению с неорганическими отмечали более высокие показатели роста [32], переваривания кормов, в частности аминокислот [33]. Несмотря на широкий спектр исследований по изучению влияния цинка на здоровье и продуктивность животных, в настоящий момент не известно, связано ли благотворное воздействие цинка исключительно с его воздействием на организм хозяина или же он оказывает позитивное влияние и на микробиоту желудочно-кишечного тракта.

В нашем исследовании наиболее высокие показатели продуктивности баранчиков отмечались при совместном использовании препаратов Йоддар-Zn и ДАФС-25. Ранее сообщалось мнение о том, что усиление действия йодсодержащих препаратов добавками селена может быть обусловлено тем, что селензависимые ферменты участвуют в дийодинации тироксина и тем самым воспрепятствуют нарушению функции щитовидной железы и регулируют синтез простогландинов [34]. Используемый в нашем исследовании препарат ДАФС-25 – органическое соединение диацетофенонилселенид (90 %) с массовой долей селена не менее 25 % [3]. Это вещество 1,5-дифенил-3-селенопентандион-1,5 (DAPS-25; селенолин, селенобел, дополнительные химические названия: диацетофенонилселенид, бис (бензоилметил) селенид) является очень малотоксичным (по сравнению, напри-

мер, с селенитами). Поэтому данное соединение в последние десятилетия весьма эффективно применяется для компенсации дефицита селена в различных организмах, а также для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Ранее было показано, что ДАФС-25 нормализует деятельность иммунной системы, оказывает антиоксидантное и детоксирующее влияние на живой организм, устраняет вероятность беломышечной болезни и жирового гепатоза печени. ДАФС-25 применяется для повышения резистентности молодняка сельскохозяйственных животных и птицы к возбудителям различных инфекционных болезней. Препарат участвует в процессах тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, выполняет роль замедлителя определенных ферментных систем, обладает антиоксидантными свойствами, а также препятствует перекислению жирных кислот и накоплению в организме ядовитых веществ, чем нормализует обмен веществ [35].

По мнению исследователей, селен является одним из важнейших микроэлементов для жвачных животных, дефицит которого является основной причиной экономических потерь, поскольку он приводит к развитию метаболической дисфункции в организме [36]. Выявлено, что при недостатке селена развивается мышечная дисфункция, происходит нарушение передачи сигналов, регулирующих рост мышечных клеток, и активация генов их атрофии [37]. Происходит подавление генов, кодирующих селенопротеин, в поджелудочной железе и скелетных мышцах [38]. Недостаток селеноцистеина, входящего в состав активных центров ферментов, участвующих в синтезе тироксина, таких как йодтирониндейодиназы и тиоредоксинредуктазы, приводит к дисфункции щитовидной железы [36, 39]. Селенопротеины, содержащие селеноцистеин, играют важную роль в функционировании Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров, которые способны убивать опухолевые клетки и патогены [40]. Считается, что селен снижает гибель клеток после тяжелых инфекций из-за его ингибирующего действия в отношении временного рецепторного потенциала меластанина 2 – кальциевого канала, участвующего в апоптозе клеток [41]. Он оказывает прямое антипатогенное действие – превращение неорганических форм (например, селенита) в двухвалентную форму элемента, окисляет тиоловые группы в активном центре вирусной тиоредоксинсульфидизомеразы, превращая их в неактивные сульфидрильные группы [42]. Дефицит селена в организме связан с такими проблемами у домашнего скота, как беломышечная болезнь, задержка плаценты, плохая вынашиваемость, остеопороз, мастит [43]. Еще одной из ключевых функций селена является противодействие окислительному стрессу [44]. Около 3 % его основной формы – селенопротеинов – участвует в синтезе Se-зависимой глутатионпероксидазы (GSH-Px), которая удаляет свободные радикалы, такие как активные формы кислорода (АФК) [39, 41]. Все компо-

ненты этой системы способствуют восстановлению дисульфидов белков в рибонуклеотидредуктазе, тиоредоксинпероксидазе и протейндисульфидизомеразе, которые регулируют синтез и репарацию ДНК, выработку антиоксидантов и функционирование эндоплазматического ретикулума [39].

Основным источником селена в рационах животных являются неорганические соли, прежде всего, селенит натрия [45]. Тем не менее по современным представлениям, биодоступность органического селена выше, чем из неорганических источников [46]. В целом полученные данные по повышению продуктивных показателей баранчиков при использовании в их рационах препарата ДАФС-25 согласуются с другими ранее проведенными исследованиями, где было продемонстрировано, что восполнение в рационах телят недостатка селена способствовало восстановлению показателей роста мышечной ткани и улучшению качества мяса [47].

**Влияние кормовых добавок на таксономический профиль микробиоты рубца.** По современным представлениям, микроорганизмы рубца, взаимодействуя с организмом хозяина посредством различных механизмов, выполняют важнейшие функции физиологии жвачных животных. Различные факторы окружающей среды, особенно рационы кормления и кормовые добавки, могут оказывать влияние на состав микробных сообществ рубца, что, в свою очередь, воздействует на процессы переваривания кормов и, следовательно, на метаболизм жвачных животных [48].

В нашем исследовании на основе метода NGS-секвенирование последовательностей гена 16S рРНК было выявлено, что доминирующими таксонами рубца баранчиков были представители филумов *Bacteroidota* и *Firmicutes* (рис. 1), что согласуется с предыдущими исследованиями для различных жвачных животных [49, 50]. *Bacteroidota* и *Firmicutes* являются одними из наиболее важных таксономических групп бактерий. Благодаря их участию в разложении растительных полисахаридов и синтезе летучих жирных кислот посредством выделения метаболических ферментов [49]. В целом доминирование в рубце филумов *Bacteroidota* и *Firmicutes* объясняет сходство бактериальных сообществ различных жвачных, рацион которых преимущественно состоит из растительных соединений.

Помимо *Bacteroidota* и *Firmicutes*, другие бактерии филума *Actinobacteriota* представляют собой ключевой таксон, который, несмотря на относительно меньшее содержание в рубце, выполняет важную роль в поддержании гомеостаза и состоянии здоровья кишечника, участвует в формировании иммунного ответа хозяина и осуществляет биодеградацию крахмала [51]. Одним из наиболее значимых таксонов филума *Actinobacteriota* является род *Bifidobacterium*. Это анаэробные актинобактерии, использующие гликозилгидролазы (GHS) для разрушения гликозидных связей между двумя или более сахарами, благодаря чему способны

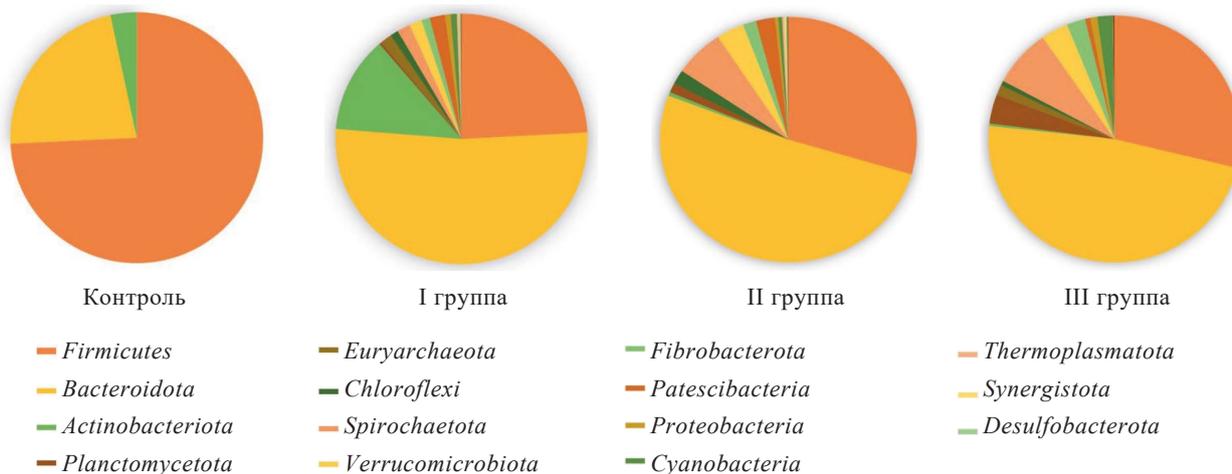


Рисунок 1. Состав микробиома рубца на уровне фил, %, у эдильбаевских баранов в возрасте 7 месяцев в зависимости от состава рациона при откорме: контрольная группа, I группа – основной рацион + Йоддар-Zn; II группа – основной рацион + ДАФС-25; III группа – основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25 (n = 5 в группе)

Figure 1. Rumen microbiome at phylum level, %, in seven-month-old Edilbay rams: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25), n = 5 per group

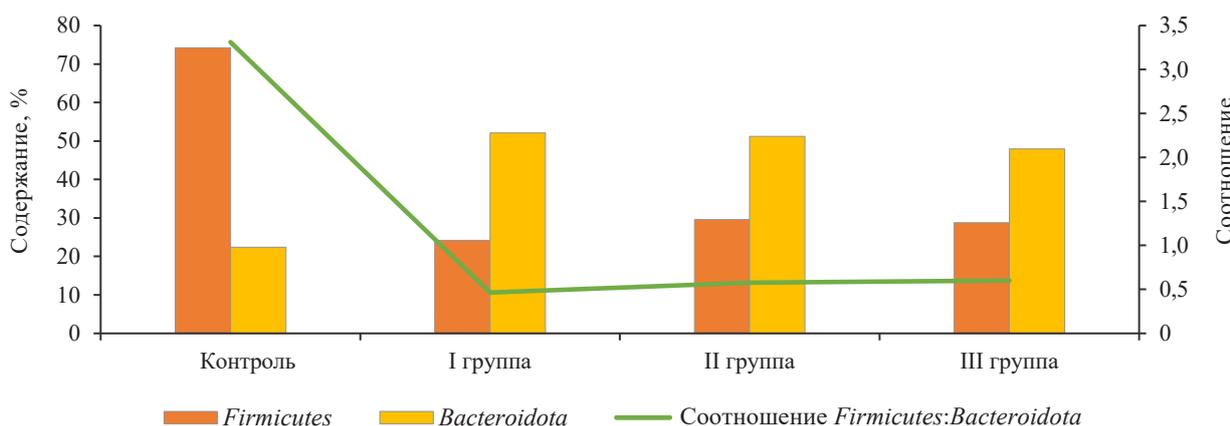


Рисунок 2. Представленность филумов *Firmicutes* и *Bacteroidota* в рубце эдильбаевских баранов в возрасте 7 месяцев в зависимости от состава рациона при откорме: контрольная группа, I группа – основной рацион + Йоддар-Zn; II группа – основной рацион + ДАФС-25; III группа – основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25 (n = 5 в группе)

Figure 2. *Firmicutes* and *Bacteroidota* in rumen of seven-month-old Edilbay rams: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25), n = 5 per group

деградировать крахмалистые полисахариды, приводя к образованию высоких концентраций ацетата, защищающих организм хозяина от размножения патогенов в пищеварительном тракте [52].

Другие выявленные в рубце баранчиков бактерии по результатам таксономической оценки были отнесены к филумам *Planctomycetota*, *Euryarchaeota*, *Chloroflexi*, *Spirochaetota*, *Verrucomicrobiota*, *Fibrobacterota*, *Patescibacteria*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Thermoplasmataota*, *Synergistota*, *Desulfobacterota*, *Elusimicrobiota*, общая представленность которых в рубце животных составила суммарно от 11,3 до 22,9 %.

Анализируя степень воздействия используемых в рационах животных кормовых добавок на основе эссенциальных микроэлементов на микробиом рубца, прежде всего, стоит отметить их существенное влияние на соотношение *Bacteroidota* и *Firmicutes*. Контрольная группа животных отличалась высоким содержанием *Firmicutes* и меньшим – *Bacteroidota*, соотношение которых составило 3,31, тогда как у особей опытных групп это отношение достоверно смещалось в сторону филума *Bacteroidota* (рис. 2).

Для оценки влияния в рационах животных кормовых добавок на основе эссенциальных микроэлементов

был проведен анализ состава микробного сообщества рубца баранчиков на уровне классов (рис. 3) и на уровне родов (рис. 4). Определены основные отличающиеся между экспериментальными группами таксономические группы микроорганизмов (рис. 5).

Оценивая микробное сообщество рубца баранчиков на уровне классов, выявлено, что у контрольной группы животных преобладающими были бактерии классов *Clostridia*, *Bacilli* и *Negativicutes*, в то время как у опытных классов *Bacteroidia*, и в меньшей степени класса *Clostridia*.

Бактерии класса *Bacteroidia* у животных опытных групп представлены преимущественно таксонами *Rikenellaceae* RC9 и *Prevotellaceae*, относительная численность которых у них была достоверно выше ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Некоторые бактерии фила *Bacteroidota* способны к разложению гемицеллюлозы в содержимом рубца [53].

Представители *Rikenellaceae* RC9 семейства *Rikenellaceae* играют важную роль в ферментации сырой клетчатки, гемицеллюлозы и метаболизме липидов [54, 55]. Ранее выявлено, что уменьшение в рационах животных количества нейтрально-детергентной клетчатки приводило к снижению содержания данных микроорганизмов [56]. Отмечается положительная корреляция между количеством в рубце бактерий семейства *Rikenellaceae* с уровнем pH в рубце и с соотношением летучих жирных кислот (ЛЖК) ацетат:пропионат [57]. Выявленное повышение содержания *Rikenellaceae* RC9 в рубце баранчиков опытных

групп может свидетельствовать об усилении у них процессов деградации некрахмалистых полисахаридов под воздействием кормовых добавок, что способствует повышению усвоения кормов и позитивно отражается на продуктивных показателях животных.

Доля в рубце животных опытных групп представителей *Prevotellaceae* UCG-003 была достоверно более высокой (при  $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольной, где они практически не выявлялись. Ранее было установлено, что *Prevotellaceae* UCG-003 способны к утилизации ЛЖК с разветвленной цепью и принимают участие в метаболизме глюкозы [58]. Согласно недавним данным, бактерии *Prevotellaceae* UCG-003 являются чувствительными к уровню pH в содержимом рубца [59].

Отмечено, что доля других представителей семейства *Prevotellaceae* рода *Prevotella* у исследуемых животных практически не отличалась. Исключением стали животные II опытной группы (основной рацион + ДАФС-25), у которых относительная численность превотелл была в 1,5 раза больше по сравнению с контрольной группой. Сообщалось, что некоторые представители рода *Prevotella* благодаря широкой ферментативной активности способны к деградации таких соединений, как протеин, крахмал и ксилан, гемицеллюлоза и пектин, преимущественно с образованием пропионата и ацетата [60–62]. Ранее была установлена положительная корреляция между высоким количеством бактерий рода *Prevotella* в рубце животных и эффективностью усвоения ими кормов [60].

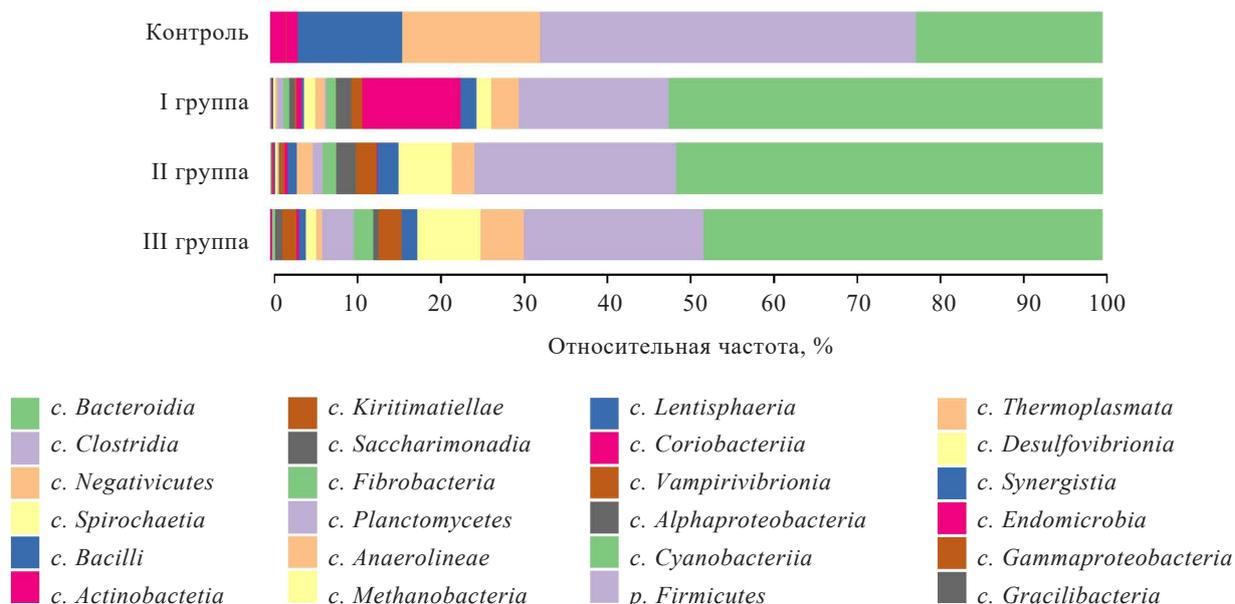


Рисунок 3. Состав микробиома рубца на уровне классов, %, у эдильбаевских баранов в возрасте 7 месяцев в зависимости от состава рациона при откорме: контрольная группа, I группа – основной рацион + Йоддар-Zn; II группа – основной рацион + ДАФС-25; III группа – основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25 (n = 5 в группе)

Figure 3. Rumen microbiome at class level, %, in seven-month-old Edilbay rams: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25), n = 5 per group

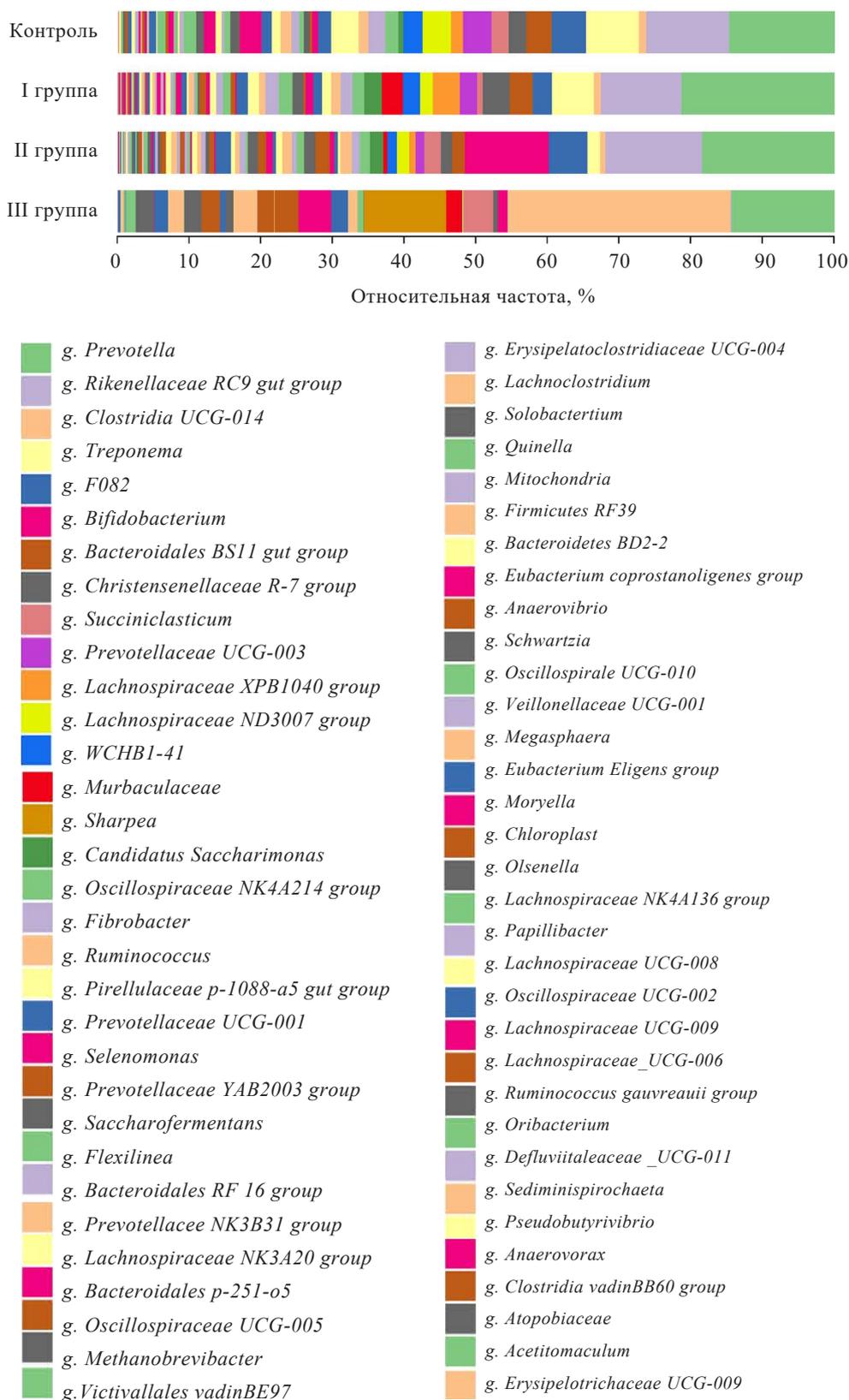


Рисунок 4. Состав микробиома рубца на уровне родов, %, у эдильбаевских баранов в возрасте 7 месяцев в зависимости от состава рациона при откорме: контрольная группа, I группа – основной рацион + Йоддар-Zn; II группа – основной рацион + ДАФС-25; III группа – основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25 (n = 5 в группе)

Figure 4. Rumen microbiome at genus level, %, in seven-month-old Edilbay rams: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25), n = 5 per group

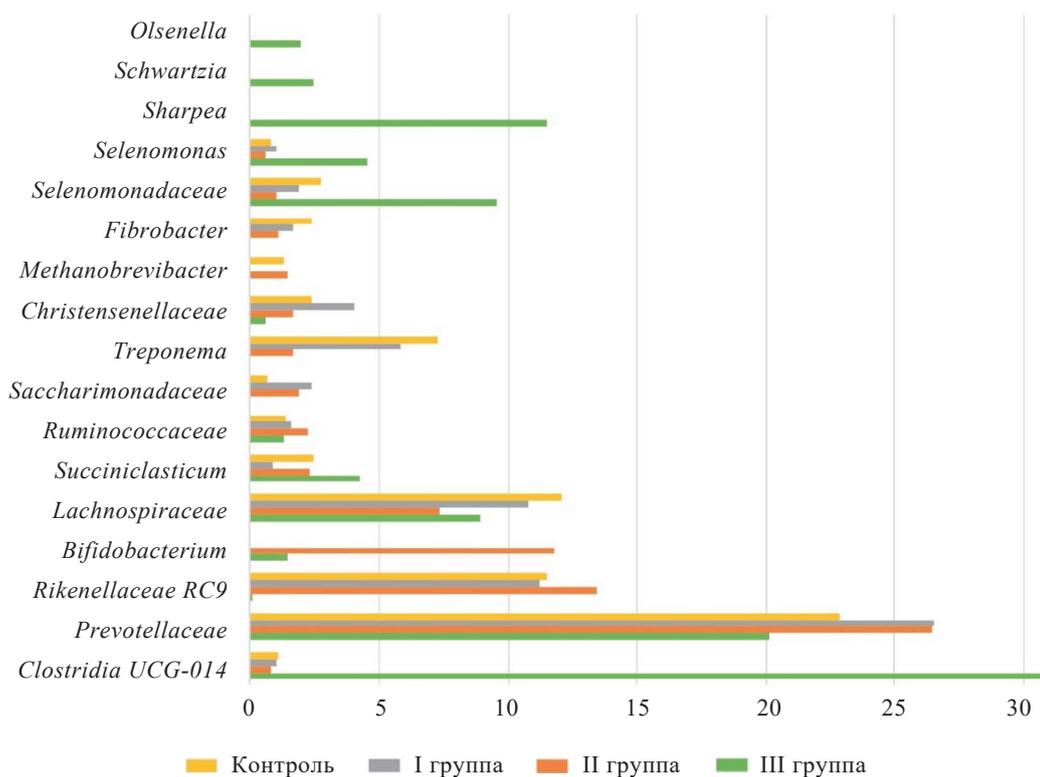


Рисунок 5. Различия в составе микробиома рубца, %, у эдильбаевских баранов в возрасте 7 месяцев в зависимости от состава рациона при откорме: контрольная группа, I группа – основной рацион + Йоддар-Zn; II группа – основной рацион + ДАФС-25; III группа – основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25 (n = 5 в группе)

Figure 5. Differences in rumen microbiome composition (%) in seven-month-old Edilbay rams: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25), n = 5 per group

Рассматривая изменения в относительной численности представителей класса *Clostridia*, произошедшие в рубце баранчиков под действием кормовых добавок, мы отметили следующие закономерности. Общее относительное содержание данных бактерий у животных контрольной группы было достоверно более высоким ( $45,22 \pm 2,41\%$ ,  $p \leq 0,05$ ) по сравнению с опытными (в I группе –  $18,05 \pm 1,07\%$ ; во II группе –  $24,30 \pm 0,94\%$  и в III группе –  $21,63 \pm 2,99\%$ ). Преобладающими в рубце баранчиков контрольной группы были представители *Clostridia\_UCG-014* ( $31,09 \pm 2,17\%$ ), что выше в 28–38 раз по сравнению с опытными группами. В настоящее время метаболические функции данного таксона практически не описаны. Ранее сообщалось о корреляционной связи количества *Clostridia\_UCG-014* в фекалиях мышей с биосинтезом пропионата [63].

Отмечено, что у опытных животных значительно повышалась доля бактерий представителей класса *Clostridia* – *Christensenellaceae* R-7 – в 2,67, 6,60 и 3,92 раза ( $p \leq 0,05$ ) для I, II и III опытных групп соответственно по сравнению с контролем. Ранее на примере других жвачных – яков – было выявлено более высокое содержание данного таксона у животных на свободном выпасе, чем у особей, которые содержались на обще-

хозяйственном рационе с включением концентратов. Сообщалось, что бактерии семейства *Christensenellaceae* тесно связаны со здоровьем животных и показателями мясной продуктивности [64]. Основными метаболитами бактерий семейства *Christensenellaceae* являются ацетат и бутират, образующиеся при сбраживании структурных углеводов [65]. Содержание данных микроорганизмов быстро изменяется в ответ на повышение в рационе количества продуктов животного или растительного происхождения [66]. В частности, корреляция между присутствием бактерий *Christensenellaceae* с катаболизмом белков и метаболитами белкового обмена [67]. Другая интересная корреляция отмечена между количеством данных микроорганизмов в рубце, шириной соска, толщиной эпителия и рогового слоя. Таким образом, повышение представленности в рубце исследованных нами животных опытных групп бактерий *Christensenellaceae* R-7 может свидетельствовать об улучшении развития рубца и, соответственно, о повышении абсорбции и переваривания питательных веществ [68].

Бактерии семейства *Lachnospiraceae* класса *Clostridia* относятся к основным представителям рубца жвачных, основным метаболитом которых является масляная кислота [69, 70]. Положительное действие

данного соединения на организм КРС связывают с его влиянием на длину, ширину и площадь поверхности эпителиальных сосочков рубца [71]. В нашем исследовании у животных опытных групп отмечена тенденция к повышению содержания данных бактерий – в 1,20 и 1,34 раза для II и III опытных групп соответственно по сравнению с контролем.

Под влиянием кормовых добавок нами детектировано повышение в рубце животных опытных групп относительной численности других бактерий родов *Fibrobacter*, *Saccharofermentans* и *Treponema*, ассоциированных с ферментацией питательных соединений кормов [72–74].

Содержание бактерий рода *Fibrobacter* в рубце животных опытных групп достоверно повышалось от значений  $0,020 \pm 0,004$  % в контрольной группе – до  $1,08 \pm 0,09$ ,  $1,66 \pm 0,12$  и  $2,38 \pm 0,21$  % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно для I, II и III групп. Данные микроорганизмы считаются одними из наиболее распространенных и эффективных деструкторов лигноцеллюлозных соединений в рубце КРС [75]. Показана высокая эффективность рода *Fibrobacter* в деградации кристаллической целлюлозы и полисахаридов клеточной стенки растений [76].

Представленность бактерий рода *Saccharofermentans* из класса *Clostridia* в рубце животных опытных групп достоверно увеличивалось от значений  $0,020 \pm 0,003$  % у контрольных животных – до  $1,56 \pm 0,12$ ,  $1,48 \pm 0,19$  и  $0,86 \pm 0,08$  % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно для I, II и III групп. Доля представителей бактерий рода *Treponema* из филума *Spirochaetota* достоверно возрастала от  $0,010 \pm 0,002$  % в контроле до  $1,68 \pm 0,13$ ,  $5,82 \pm 0,41$ ,  $7,28 \pm 1,24$  % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно для I, II и III групп. Установлено, что относительная доля бактерий родов *Fibrobacter* и *Treponema* имела высокие коэффициенты корреляции с соотношением ацетат:пропионат и молярной долей ацетата. Применение кормовых добавок, в особенности у групп II и III, способствовало смещению отношения ЛЖК в рубце животных опытных групп в сторону ацетата. Выявлена способность бактерий филы *Spirochaetota* к разложению пектина и гемицеллюлозы в рубце КРС и чувствительность к изменениям уровня pH. У некоторых представителей данной филы обнаружены липополисахариды на внешней мембране, выступающие в качестве основного поверхностного антигена [77].

У животных опытной группы I, рацион которой содержал кормовую добавку Йоддар-Zn, отмечено значительное увеличение относительной численности рода *Bifidobacterium* филума *Actinobacteriota* (в 3,71 раза при  $p \leq 0,05$ ), которые способны к деградации крахмалистых полисахаридов преимущественно с образованием ацетата, проявляющего, как правило, высокие антимикробные свойства в отношении патогенов [52]. Соответственно, кормовая добавка Йоддар-Zn, в составе которой содержатся цинк и йод, потенциально способна оказывать высокий вклад в продуктивность

и здоровье жвачных путем модуляции бактериального сообщества рубца.

Интересно, что в нашем исследовании выявлено достоверно более высокое содержание в рубце животных I и II опытных групп метаногенных архей рода *Methanobrevibacter* из филума *Euryarchaeota*, относительная численность которых повышалась от  $0,020 \pm 0,004$  до  $1,47 \pm 0,17$  и  $1,33 \pm 0,12$  % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно. В большинстве исследований содержимого рубца дойных коров род *Methanobrevibacter*, преимущественно использующий  $H_2$  в качестве субстрата для восстановления  $CO_2$  до  $CH_4$ , являлся доминирующим [6].

Высокое значение в процессах ферментации кормов в рубце жвачных играют ЛЖК-синтезирующие и ЛЖК-ферментирующие бактерии порядка *Negativicutes* [16]. Известно, что ЛЖК подавляют условно-патогенные микроорганизмы и являются питательными соединениями для организма-хозяина и микробиоты рубца. В связи с этим наличие определенных ЛЖК может приводить к коррекции многочисленных обменных процессов в организме хозяина, в частности, способствуя повышению иммунитета и продуктивности жвачных животных. Отмечено, что у животных контрольной группы относительное количество данных микроорганизмов бактерии *Negativicutes* (в т. ч. представителей родов *Selenomonas*, *Oscillospiraceae* UCG-005, *Anaerovibrio*, *Megasphaera*, *Succiniclaticum*) было достоверно выше – в 4,93, 6,03 и 3,17 раза соответственно ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с показателями для I, II и III опытных групп. Ранее сообщалось, что представленность данных бактерий в рубце жвачных отрицательно коррелировала с уровнем pH и положительно – с количеством пропионата [78].

Более высокой у животных контрольной группы была и относительная доля продуцентов молочной кислоты рода *Olsenella* из филы *Actinobacteriota* ( $p \leq 0,05$ ). У животных контрольной группы значимо более высокой была представленность доля кислот-образующих бактерий рода *Sharpea* из семейства *Erysipelatoclostridiaceae*, *Sharpea azabuensis* и *Megasphaera* sp. Ранее было показано, что данные микроорганизмы выступают в качестве важных лактат-продуцирующих микроорганизмов, увеличение доли которых в рубце овец сопровождалось повышением числа транскриптов, связанных с биосинтезом лактата, пропионата и бутирата, и меньшим количеством выделяемого животными метана [79].

Вместе с тем в рубце баранчиков II и III групп, рационы которых содержали кормовую добавку ДАФС-25, достоверно повышалась представленность бактерий рода *Quinella* из порядка *Negativicutes*. У животных всех опытных групп наблюдалась тенденция к повышению содержания других кислот-ферментирующих представителей *Veillonellaceae* UCG-001 из класса *Negativicutes*. Сообщалось, что численность рода *Quinella* снижается с повышением количества

концентратов в рационах животных и отрицательно коррелирует с концентрацией пропионата и уровнем рН в рубце животных [80].

Доля представителей *Proteobacteria*, *Mycoplasma*, *Escherichia-Shigella*, роль которых традиционно связана с развитием различных воспалительных процессов у всех исследуемых животных, была минорной и практически не менялась при использовании в рационах кормовых добавок.

Таким образом, очевидно, что введение в рацион баранчиков всех исследуемых кормовых добавок отразилось на микробиоме рубца, смещая его потенциальные метаболические функции в сторону усиления деградации растительных полисахаридов с изменением соотношения ЛЖК в сторону повышения биосинтеза ацетата и снижения пропионата. В совокупности выявляемые при использовании в рационах животных кормовых добавок закономерности модификации микробиома свидетельствуют об их позитивном влиянии на метаболические процессы в организме баранчиков, являясь предпосылкой более полного усвоения кормовых ингредиентов, что и явилось причиной повышения продуктивности животных опытных групп.

Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными. В целом, все используемые в рационах баранчиков кормовые добавки приводили к повышению в рубце доли бактерий, участвующих в деградации некрахмалистых полисахаридов. Аналогичный эффект детектирован С. Wang с соавторами в исследовании влияния различных дозировок цинка (10, 20 или 30 мг/кг ZnSO<sub>4</sub> в сухом веществе) в рационах дойных коров голштинской породы на состав микробиома рубца [81]. В исследовании под действием высоких дозировок цинка отмечено повышение представленности общего количества бактерий и, в частности, целлюлозолитических видов – *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* и *Butyrivibrio fibrisolvens*. В другом исследовании на ягнятах, рацион которых включал 70 мг/кг цинка в сухом веществе в виде хелатного комплекса цинка с аминокислотами, также отмечены значительные сдвиги в относительной численности микроорганизмов, связанных с ферментацией кормов. При этом повышение в рубце доли целлюлозолитических бактерий *Ruminococcus albus* и продуцентов молочной кислоты *Streptococcus bovis* наряду со снижением представленности *Ruminococcus flavefaciens* [82]. Повышение в рационах животных селена приводило к существенному увеличению содержания целлюлозолитических бактерий семейства *Lachnospiraceae* [16], общего количества анаэробных грибов-хитридиомитетов, простейших, метаногенов и бактерий *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminobacter amylophilus* [17, 83, 84]. Селенит натрия в различных концентрациях способствовал повышению активности целого спектра ферментов – ксиланазы, протеазы и  $\alpha$ -амилазы,

пектиназы, целлюбиазы и карбоксиметилцеллюлазы в рубце [17, 83, 84].

Интересно, что в нашем эксперименте применение кормовой добавки ДАФС-25 отдельно и в сочетании с Йоддар-Zn (II и III опытные группы) приводило к наибольшему увеличению содержания микроорганизмов, метаболические способности которых в основном связаны с образованием ацетата – *Fibrobacter*, *Lachnospiraceae*, *Saccharimonadaceae*, *Treponema*, *Christensenellaceae*. Полученные данные согласуются с исследованиями на ягнятах и овцах, получающих в составе рациона органические или неорганические источники селена. У опытных групп животных отмечено повышение в рубце количество таких ЛЖК, как изобутират и изовалерат [85]. В других экспериментах исследователи, напротив, при использовании в рационах различных источников селена отмечали усиление образования пропионата по отношению к другим ЛЖК в рубце дойных коров, быков голштинской породы, коз, овец и ягнят [16, 17, 85–87]. Добавление селена в рационы животных сопровождалось улучшением усвояемости сухого вещества, органического вещества, сырого протеина, нейтрально-детергентной, кислотно-детергентной и сырой клетчатки, крахмала у различных видов жвачных [17, 83, 86, 88].

**Влияние кормовых добавок на функциональный профиль микробиоты рубца.** Для изучения влияния кормовых добавок на функциональный профиль микробиоты рубца баранчиков использовали программное обеспечение PICRUSt, позволяющее проводить прогнозирование функций микробных сообществ. Это один из современных инструментов для анализа функционального профиля, который все чаще применяется для исследования микробиоты желудочно-кишечного тракта человека и животных. Базы данных PICRUSt основаны на результатах высокопроизводительного секвенирования микробиомов и отдельных штаммов. По результатам реконструкции и функциональной аннотации базы данных Metacyc-pathway в микробном сообществе рубца баранчиков мы обнаружили 323 прогнозируемых метаболических путей. Большинство выявленных метаболических путей оказались связанными с такими прогнозируемыми функциями, как метаболизм аминокислот, кофакторов и витаминов, углеводов, гликанов, энергетический метаболизм.

Анализируя представленность метаболических путей различных функциональных категорий со значительными различиями в зависимости от применения кормовых добавок, мы обнаружили значительные отличия по активности 126 прогнозируемых метаболических путей между экспериментальными группами. Наиболее отличающимися были пути, связанные с энергетическим обменом, метаболизмом жирных кислот, углеводов, мочевины, аминокислот, кофакторов и витаминов. Различия отмечены по метаболическим путям микробиоты рубца, которые относились к белко-

вому (биосинтез аминокислот, превращение азотистых соединений), липидному (биосинтез липидов, олеата, пальмитолеата), углеводному (расщепление сложных полисахаридов), энергетическому обмену (цикл Кребса), синтезу ЛЖК (уксусной, пропионовой, масляной, молочной), нуклеиновых кислот, нуклеотидов и нуклеозидов, кофакторов и коферментов (ацетил-СоА, убихинолы 7-10), витаминов, образованию клеточной стенки и спорообразованию (синтез пептидогликана, тейховых кислот).

При использовании в рационах животных кормовых добавок нами наблюдалось выраженное усиление метаболических путей, связанных с углеводным и энергетическим обменом. В частности, интересные закономерности отмечены под влиянием кормовых добавок в рубце животных, связанные с прогнозируемыми путями метаболизма ЛЖК (рис. 6).

Во всех экспериментальных группах на фоне кормовых добавок отмечалось значительное достоверное ( $p \leq 0,05$ ) повышение в микробиоме рубца относительного обилия путей, связанных с биосинтезом (R,R)-бутандиола P125-PWY (superpathway of (R,R)-butanediol biosynthesis) от  $0,020 \pm 0,004$  % в контрольной группе до  $6,65 \pm 0,41$ ,  $7,74 \pm 0,36$ ,  $4,74 \pm 0,17$  % – в опыт-

ных группах I, II и III соответственно. В настоящее время метаболическая функция 2,3-бутандиола изучена недостаточно. Данное соединение может предотвращать внутриклеточное закисление посредством образования нейтральных соединений вместо кислот. Также сообщалось об участии данного метаболического пути в регуляции соотношения NADH/NAD + у бактерий [74].

Под действием кормовой добавки ДАФС-25 у животных II опытной группы отмечено значимое повышение относительного обилия генов пути ферментации L-лизина до ацетата и бутаноата P163-PWY (L-lysine fermentation to acetate and butanoate) в 14,2 раза ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контрольными животными. У животных I и II опытных групп, в рационах которых вводили препараты Йоддар-Zn и ДАФС-25, отмечалась тенденция к повышению обилия генов путей ферментации пирувата в бутаноат CENTFERM-PWY (pyruvate fermentation to butanoate) в 1,25 и 1,33 раза, суперпути PWY-6590 ацидогенной ферментации *Clostridium acetobutylicum* (superpathway of *Clostridium acetobutylicum* acidogenic fermentation) в 1,24 и 1,31 раза, пути  $\beta$ -окисления жирных кислот I FAO-PWY (fatty acid and beta;-oxidation I) в 1,37 и 1,44 раза.

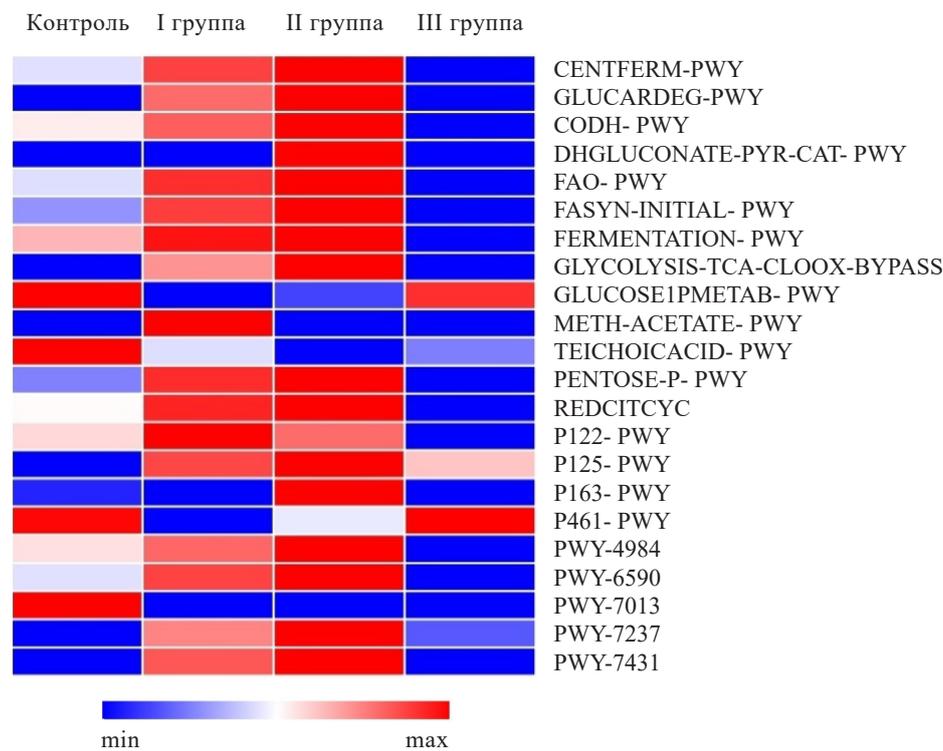


Рисунок 6. Различия в представленности основных прогнозируемых метаболических путей в микробиоме рубца, %, у эдильбаевских баранов в возрасте 7 месяцев в зависимости от состава рациона при откорме: контрольная группа, I группа – основной рацион + Йоддар-Zn; II группа – основной рацион + ДАФС-25; III группа – основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25 (n = 5 в группе)

Figure 6. Differences in major predicted metabolic pathways in the rumen microbiome, %, in seven-month-old Edilbay rams: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25), n = 5 per group

Полученные результаты об изменении относительного обилия прогнозируемых метаболических путей обмена ЛЖК под влиянием кормовых добавок согласуются с продемонстрированными выше результатами таксономического анализа микробиома рубца баранчиков по повышению представленности ЛЖК-продуцирующих бактерий. Ранее сообщалось об ассоциации метаболических путей биосинтеза бутаноата с целлюлозолитическими микроорганизмами, в т. ч. *Roseburia hominis*, *Ruminococcus callidus*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroides uniformis* [89–91]. Известно, что бактерии *Clostridium acetobutylicum* являются продуцентами таких ценных продуктов, как бутанол, ацетон и этанол.

Представленность других метаболических путей, связанных с ферментацией кислот, была выше у животных I и II опытных групп. Одним из них является путь FERMENTATION-PWY (mixed acid fermentation), относительное обилие которого повышалось в микробиоме животных в 1,13 и 1,14 раза соответственно. В ходе данного метаболического пути происходит выделение в анаэробной среде энергии посредством фосфорилирования на уровне субстрата, при котором донором электронов выступает органическое соединение, а акцептором электронов – другое органическое соединение с меньшим содержанием энергии.

Интересно, что в микробном сообществе рубца животных всех опытных групп происходило достоверное ( $p \leq 0,05$ ) снижение относительного обилия генов метаболического пути деградации L-1,2-пропандиола PWY-7013 (L-1,2-propanediol degradation), в ходе которого образуется пропанат (пропионат). Пропионат является одним из важнейших предшественников образования глюкозы, выступая при этом в качестве одного из важнейших факторов поддержания процесса глюконеогенеза. В ходе глюконеогенеза происходит высвобождение части оксалоацетата, тогда как ацетат активно начинает включаться в цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса) с выделением энергии.

Под влиянием кормовых добавок Йоддар-Zn и ДАФС-25 в рубцовой жидкости животных опытных групп I и II по сравнению с контролем происходило снижение относительного содержания генов метаболического пути P461-PWY (hexitol fermentation to lactate, formate, ethanol and acetate) ферментации гексита до лактата, формиата, этанола и ацетата – в 1,52 и 1,33 раза. В рамках данного пути конечный продукт гликолиза – пируват – может затем метаболизироваться различными способами, что приводит к образованию (S)-лактата, формиата, этанола и ацетата в зависимости от условий. При наличии избытка глюкозы основным продуктом ферментации является (S)-лактат, но при ограничении количества глюкозы образуются только формиат, этанол и ацетат [92].

У баранчиков I и II опытных групп наблюдалась тенденция к увеличению относительного содержания прогнозируемых путей биосинтеза лактата. Об этом

свидетельствует активация пути P122-PWY (heterolactic fermentation – ферментация глюкозы в лактат), в котором при использовании глюкозы в качестве источника углерода происходит образование эквимольных количеств лактата, этанола и диоксида углерода и следов ацетата [92].

Обращает на себя внимание более высокое у животных опытной группы I по сравнению с другими животными обилие генов путей метаногенеза из ацетата METH-АЦЕТАТЕ-PWY (methanogenesis from acetate), при котором происходит фосфорилирование ацетата до ацетил-КоА, который затем подвергается ферментативному превращению под действием комплекса ацетил-КоА декарбонилазы / синтазы [93].

В целом полученные нами результаты свидетельствуют о потенциальной активации прогнозируемых метаболических путей, связанных с биосинтезом различных ЛЖК, таких как пропионат, ацетат, бутират, что подтверждается данными о представленности в рубце животных исследуемых групп ряда микроорганизмов. Интересно, что в опытных группах животных при использовании в рационах кормовых добавок Йоддар-Zn и ДАФС-25 преимущественно наблюдалась активация прогнозируемых метаболических путей, связанных с биосинтезом масляной и уксусной кислот, тогда как в контрольной группе животных и при совместном использовании кормовых добавок преобладали метаболические пути биосинтеза пропионата.

Интересные закономерности отмечены нами при анализе прогнозируемых метаболических путей, ассоциированных с окислением глюкозы у животных I и II опытных групп. В частности, при использовании в рационах баранчиков препарата ДАФС-25 наблюдалась достоверная ( $p \leq 0,05$ ) активация пути окислительной деградации глюкозы DHGLUCONATE-PYR-CAT-PWY (glucose degradation, oxidative).

Введение в рационы животных I и II опытных групп кормовых добавок Йоддар-Zn и ДАФС-25 приводило к достоверному ( $p \leq 0,05$ ) повышению активности метаболических путей суперпути гликолиза, пируватдегидрогеназы, ТСА и образованию глиоксилата GLYCOLYSIS-TCA-GLYOX-BYPASS (superpathway of glycolysis, pyruvate dehydrogenase, TCA, and glyoxylate bypass). У I и II опытных групп повышалась активация путей пентозофосфатного пути окисления глюкозы PENTOSE-P-PWY (pentose phosphate pathway) и пути ацетил-КоА CODH-PWY (reductive acetyl coenzyme A pathway). Полученные закономерности свидетельствуют об усилении путей микробного биосинтеза и окисления глюкозы.

Введение в рационы животных I и II опытных групп приводило к угнетению пути деградации глюкозы и глюкозо-1-фосфата GLUCOSE1PMETAB-PWY (glucose and glucose-1-phosphate degradation) в 1,48 и 1,40 раза по сравнению с контрольной группой. Это может свидетельствовать о более высокой скорости метаболизма посредством гликолиза или возмож-

ном накоплении гликогена под влиянием кормовых добавок Йоддар-Zn и ДАФС-25 [94].

Помимо этого, у животных опытных групп I и II отмечается активация путей биосинтеза жирных кислот, выявлено усиление суперпути инициации биосинтеза жирных кислот FASYN-INITIAL-PWY (superpathway of fatty acid biosynthesis initiation) и пути цикла мочевины PWY-4984 (urea cycle). Функции жирных кислот в организме связаны со строительством блоков для синтеза фосфолипидных компонентов мембран клеток, обеспечением внутриклеточных коммуникаций посредством передачи липидов и тиоэфиров (ацил-транспортирующие белки) [95]. В ходе метаболического пути PWY-4984 (urea cycle) происходит образование мочевины из аминокрупп аммиака и L-аспартата, где промежуточными продуктами выступают L-орнитин, L-цитруллин, L-аргинино-сукцинат и L-аргинин.

При введении в рационы животных кормовых добавок отмечалось усиление метаболических путей, связанных с метаболизмом витаминов и кофакторов, в т. ч. коэнзимов B (P241-PWY) и M (P261-PWY), аденозилкобаламина (P381-PWY), биотина (BIOTIN-BIOSYNTHESIS-PWY, PWY-5005), никотинамида (NAD-

BIOSYNTHESIS-II NAD), пиримидоксина (PYRI-DOXSYN-PWY), филлохинона (PWY-5863), убихинона (PWY-6708), пиримидина (PWY-7198), менахинона (PWY-5896, PWY-5897 и др.) (рис. 7).

Повышение представленности прогнозируемых метаболических путей биосинтеза витамина B6, убихинона и других терпеноид-хинонов, рибофлавина и путей пентозофосфата может свидетельствовать о усилении биосинтеза жирных кислот, что соотносится с описанными выше закономерностями. Ранее было обнаружено, что биосинтез биотина II (PWY-5005) коррелирует с образованием пропионата в рубце. Биотин является важнейшим коферментом в образовании комплекса ацетил-КоА-карбоксилазы, пропионил-КоА-карбоксилазы и пируваткарбоксилазной активности [96]. Пропионил-КоА-карбоксилаза отвечает за преобразование (S)-метилмалонил-КоА в пропаноил-КоА, а затем пропаноил-КоА путем использования сукцината преобразуется в пропионат, который может использоваться для удовлетворения метаболических потребностей организма-хозяина и микробиоты рубца [96, 97].

Ранее была выявлена положительная корреляция между образованием биотина (PWY-5005), биосинтезом

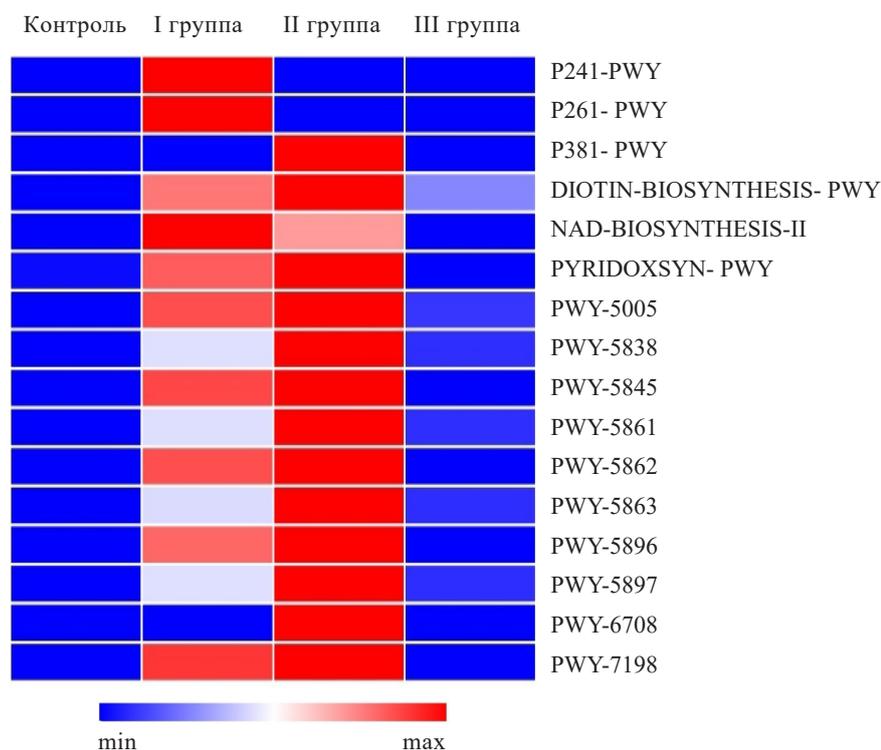


Рисунок 7. Различия в представленности прогнозируемых путей метаболизма витаминов и кофакторов в микробиоме рубца, %, у эдильбаевских баранов в возрасте 7 месяцев в зависимости от состава рациона при откорме: контрольная группа, I группа – основной рацион + Йоддар-Zn; II группа – основной рацион + ДАФС-25; III группа – основной рацион + Йоддар-Zn + ДАФС-25 (n = 5 в группе)

Figure 7. Differences in predicted vitamin and cofactor metabolic pathways in rumen microbiome, %, in seven-month-old Edilbay rams: control (no additives), experimental group I (Yoddar-Zn), experimental group II (DAFS-25), and experimental group III (Yoddar-Zn + DAFS-25), n = 5 per group

в рубце некоторых ЛЖК и присутствием в рубце таких бактерий, как *Fibrobacter*, *Butyrivibrio*, *Lachnospiraceae* NK4A136, *Ruminococcaceae* UCG-013 и *Eubacterium oxidoreducens*, а также отрицательная корреляция с представленностью бактерий родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, биосинтезом молочной кислоты и гексоз. Виды бактерий *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* не имеют пути синтеза биотина, однако экспрессируют свободный транспортер биотина, что предполагает конкуренцию данных микроорганизмов с хозяином за образуемый витамин. Поскольку биотин необходим для выживания и роста микроорганизмов, снижение количества биотина может приводить к дисбиозу кишечника [98].

При использовании в рационах животных добавок, обогащенных эссенциальными микроэлементами, в содержимом рубца наблюдалось снижение активности пути биосинтезом тейхоевой кислоты поли (глицерол-фосфатной) стенки (TEICHOICACID-PWY – teichoic acid (poly-glycerol) biosynthesis). Ранее положительная корреляционная связь обнаружена между биосинтезом лактата, содержанием бактерий *Lactobacillus* и биосинтезом тейхоевой кислоты поли (глицерол-фосфатной) стенки. Тейхоевые кислоты, которые ковалентно связаны с пептидогликаном цитоплазматической мембраны грамположительных бактерий, важны для целостности клеточной стенки [99]. Увеличение концентрации потенциально воспалительных веществ, таких как липополисахариды (ЛПС) и липотейхоевые кислоты (ЛТА), обычно связано с дисбактериозом [100].

Под действием кормовых добавок в рационах у животных опытных групп наблюдалась активация пути биосинтеза биогенных аминов (PWY-7431 – aromatic biogenic amine degradation), который связан с бактериальной деградацией ароматических кольцевых гидроксильрованных биогенных аминов – октопамина, тирамина, дофамина и (R)-синефрина. Ароматические и алифатические биогенные амины синтезируются путем декарбоксилирования аминокислот и выполняют важные физиологические функции как у эукариот, так и у прокариот. Отмечалось, что ароматические биогенные аминокислоты могут иметь антистрессовый эффект [101].

Итак, выявленные закономерности свидетельствуют о выраженном позитивном влиянии кормовых добавок на таксономический и функциональный профиль микробиома рубца, что способствовало коррекции метаболических функций организма и оказало действие на продуктивность баранчиков. В настоящее время механизмы регуляции метаболизма, в частности энергетического, у жвачных животных под действием микроэлементов детально не изучены. Согласно современным представлениям, взаимодействие микроорганизмов и метаболитов в рубце может влиять на формирование фенотипических признаков у хозяина [102]. Вероятно, действие микроэлементов способствует

улучшению функционирования пищеварительных процессов у жвачных животных посредством множества взаимосвязанных механизмов, что и приводит к более эффективной ферментации кормов в рубце. В нашем исследовании введение в рационы кормовых добавок на основе йода, цинка и селена приводило к изменению состава микробиоты рубца и его метаболической активности, в т. ч. повышению доли целлюлозолитических микроорганизмов и видов, способных к использованию микроэлементов. Повышение представленности углеводов-активных бактерий в рубце способствует активации образования энергии в организме жвачных, преимущественно за счет образования ЛЖК. Летучие жирные кислоты поддерживают pH рубца на оптимальном уровне, а также влияют на различные сигнальные механизмы, связанные с регуляцией состояния иммунитета и роста животных. В целом эти данные согласуются с полученными ранее сведениями исследователей и нашими результатами по продуктивным показателям животных при использовании кормовых добавок Йоддар-Zn и ДАФС-25.

Изменения в составе микробиома исследованных баранчиков под действием кормовых добавок могут быть обусловлены тем, что микроорганизмы имеют свои потребности в микроэлементах. Сообщалось о влиянии микроэлементов на здоровье кишечника, о чем свидетельствует улучшение показателей его развития и усиления барьерной функции, а также содержания микробиоты [103]. Согласно исследованиям А. Mehri, йод может усиливать активность ряда ферментов [104]. В исследовании Е. У. Hilal с соавторами, показано, что цинк может не только напрямую влиять на организм-хозяина, но и оказывать действие непосредственно на микробиоту рубца [105]. На примере цинка установлено, что микроорганизмы рубца могут иметь собственную потребность в данном микроэлементе. W. J. Miller сообщал о том, что добавление в рационы жвачных животных растворимых источников цинка может быть перенаправлено на микроорганизмы желудочно-кишечного тракта, о чем свидетельствует низкая концентрация данного микроэлемента в сыворотке крови исследуемых животных [82, 106]. В экосистемах с высокой микробной биомассой и широким разнообразием конкуренция за микроэлементы может быть значительной, при этом одним из ее признаков является высокое сродство к ресурсам их поступления [107]. Высокие уровни цинка вытесняют марганец *Streptococcus pneumoniae*, вызывая гибель их клеток [108]. В другом случае, при введении в рационы овец цинка в сочетании с пробиотическими штаммами родов *Bacillus*, *Lactobacillus* и *Saccharomyces*, усвоение цинка организмом хозяина повышалось [109]. По мнению авторов, на эффективность действия микроэлементов как микробиотой рубца, так и организмом жвачных влияет их биодоступность. Неорганический селен может быть высокотоксичным и с мень-

шей вероятностью попадает в молоко и мясо, что ограничивает рост растущих животных (например, ягнят и телят) [110–118].

### Выводы

В исследовании был проведен анализ состава и функционального профиля микробиома рубца баранчиков методом NGS-секвенирования для оценки влияния на него органических добавок, обогащенных эссенциальными микроэлементами.

Полученные результаты продемонстрировали, что наиболее значимые изменения в микробиоме рубца наблюдаются на фоне применения кормовых добавок, используемых в рационах животных. Были связаны с изменением в рубце соотношения представителей фил *Firmicutes: Bacteroidetes*, в частности с повышением содержания бактерий, участвующих в деградации некрахмалистых полисахаридов. Выявленные закономерности в изменении микробиома под действием кормовых добавок свидетельствуют о потенциальном смещении метаболических процессов микробиоты рубца в сторону образования ацетата и снижения пропионата. Применение кормовой добавки ДАФС-25 отдельно и в сочетании с Йоддар-Zn приводило к наибольшему увеличению содержания микроорганизмов, метаболические способности которых в основном связаны с образованием ацетата – *Fibrobacter*, *Lachnospiraceae*, *Saccharimonadaceae*, *Treponema*, *Christensenellaceae*. Одновременно в рубце исследуемых животных происходило снижение пропионат-синтезирующих бактерий порядка *Negativicutes* и лактат-синтезирующих видов рода *Sharpea*. Доля представителей *Proteobacteria*, *Mycoplasma*, *Escherichia-Shigella*, роль которых традиционно связана с развитием различных воспалительных процессов, у всех исследуемых животных была минорной и практически не менялась при использовании в рационах кормовых добавок.

Для изучения влияния кормовых добавок на функциональный профиль микробиоты рубца баранчиков использовали программное обеспечение PICRUST, позволяющее проводить прогнозирование функций микробных сообществ. При использовании в рационах животных кормовых добавок наблюдалось усиление метаболических путей, связанных с углеводным и энергетическим обменом, в частности, с путями мета-

болизма ЛЖК. На фоне применения в рационах баранчиков добавок, обогащенных эссенциальными микроэлементами, отмечалось усиление метаболических путей, связанных с метаболизмом витаминов и кофакторов. В совокупности выявляемые при использовании кормовых добавок в рационах животных закономерности модификации микробиома свидетельствуют о позитивном влиянии на метаболические процессы, являясь предпосылкой более полного усвоения кормовых ингредиентов, которые и послужили причиной повышения продуктивности животных опытных групп. Выявленные изменения в микробном сообществе рубца положительно соотносятся с результатами повышения продуктивных показателей животных в результате скармливания кормовой добавки.

Результаты исследований микробиома содержимого рубца баранчиков позволяют констатировать, что кормовые добавки ДАФС-25 и Йоддар-Zn не оказывают отрицательного влияния на качество баранины, и утверждать о возможности их применения при откорме животных в промышленных условиях. Применение метода NGS-секвенирования открывает путь к созданию новых эффективных технологий выращивания мелкого рогатого скота, а также позволяет оценить безопасность применения обогащенных рационов при откорме животных в промышленных условиях.

### Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Contribution

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

### Conflict of interest

The authors declared no potential conflict of interests regarding the research, authorship, and / or publication of this article.

### References/Список литературы

1. Henchion M, Hayes M, Mullen AM, Fenelon M, Tiwari B. Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*. 2017;6(7):53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
2. Hunter MC, Smith RG, Schipanski ME, Atwood LW, Mortensen DA. Agriculture in 2050: recalibrating targets for sustainable intensification. *Bioscience*. 2017;67(4):386–391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
3. Gorlov IF. Selenium in cattle feeds and dietary supplements. Moscow: Vestnik of the Russian Agricultural Science, 2005. 189 p. (In Russ.). [Горлов И. Ф. Использование селена при производстве продукции животноводства и БАДов. Москва: Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук, 2005. 189 с.]. <https://elibrary.ru/QKWTOX>

4. Bogolyubova NV, Korotky VP, Zenkin AS, Ryzhov VA, Buryakov NP. Digestion and metabolism indices of sheep when using activated charcoal supplement. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 2017;17(2):121–127. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2017.121.127>
5. Newbold CJ, Ramos-Morales E. Review: ruminal microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. *Animal*. 2020;14(1):s78–s86. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003252>
6. Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Collaborators GRC, et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*. 2015;5:14567. <https://doi.org/10.1038/srep14567>
7. Tapio I, Fischer D, Blasco L, Tapio M, Wallace RJ, Bayat AR, et al. Taxon abundance, diversity, co-occurrence and network analysis of the ruminal microbiota in response to dietary changes in dairy cows. *PloS One*. 2017;12(7):e0180260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180260>
8. Fomichev YuP, Bogolyubova NV, Romanov VN, Kolodina EN. Comparative assessment of natural feed additives for functional effects on the digestive processes in the rumen of sheep (*Ovis Aries*). *Agricultural Biology*. 2020;55(4):770–783. (In Russ.). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.4.770rus>; <https://elibrary.ru/PVTONG>
9. Kobayashi Y, Oh S, Myint H, Koike S. Use of Asian selected agricultural byproducts to modulate rumen microbes and fermentation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2016;7:70. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0126-4>
10. Hendawy AO, Shirai M, Takeya H, Sugimura S, Miyanari S, Taniguchi S, et al. Effects of 5-aminolevulinic acid supplementation on milk production, iron status, and immune response of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(12):11009–11015. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15982>
11. Nabi F, Arain MA, Hassan F, Umar M, Rajput N, Alagawany M, et al. Nutraceutical role of selenium nanoparticles in poultry nutrition: A review. *World's Poultry Science Journal*. 2020;76(3):459–471. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1789535>
12. Hendawy AO, Sugimura S, Sato K, Mansour MM, Abd El-Aziz AH, Samir H, et al. Effects of selenium supplementation on rumen microbiota, rumen fermentation, and apparent nutrient digestibility of ruminant animals: a review. *Fermentation*. 2022;8(1):4. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010004>
13. Liu C, Li XH, Chen YX, Cheng ZH, Duan QH, Meng QH, et al. Age-related response of rumen microbiota to mineral salt and effects of their interactions on enteric methane emissions in cattle. *Microbial Ecology*. 2017;73:590–601. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0888-4>
14. Váradyová Z, Mravčáková D, Holodová M, Grešáková E, Písařčíková J, Barszcz M, et al. Modulation of ruminal and intestinal fermentation by medicinal plants and zinc from different sources. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2018;102(5):1131–1145. <https://doi.org/10.1111/jpn.12940>
15. Vigh A, Criste A, Gragnic K, Moquet L, Gerard C. Ruminal solubility and bioavailability of inorganic trace mineral sources and effects on fermentation activity measured in vitro. *Agriculture*. 2023;13(4):879. <https://doi.org/10.3390/agriculture13040879>
16. Cui X, Wang Z, Tan Y, Chang S, Zheng H, Wang H, et al. Selenium Yeast Dietary Supplement Affects Rumen Bacterial Population Dynamics and Fermentation Parameters of Tibetan Sheep (*Ovis aries*) in Alpine Meadow. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:663945. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663945>
17. Zhang ZD, Wang C, Du HS, Liu Q, Guo G, Huo WJ, et al. Effects of sodium selenite and coated sodium selenite on lactation performance, total tract nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows. *Animal*. 2020;14(10):2091–2099. <https://doi.org/10.1017/S1751731120000804>
18. Naderi M, Puar P, Zonouzi-Marand M, Chivers DP, Niyogi S, Kwong RWM. A comprehensive review on the neuropathophysiology of selenium. *Science of The Total Environment*. 2021;767:144329. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144329>
19. Ishaq SL, Johnson SP, Miller ZJ, Lehnhoff EA, Olivo S, Yeoman CJ, et al. Impact of cropping systems, soil inoculum, and plant species identity on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology*. 2017;73:417–434. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0861-2>
20. Koloskova EM, Ezerskiy VA, Ostrenko KS, Ovcharova AN, Belova NV. Studies of the sheep rumen microbiome using molecular genetic methods: a review. *Problems of Productive Animal Biology*. 2020;(4):5–26. (In Russ.). <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.4.5-26>; <https://elibrary.ru/VXFFAO>
21. Grabez V, Coll-Brasas E, Fulladosa E, Hallenstvedt E, Håseth TT, Øverland M, et al. Seaweed inclusion in finishing lamb diet promotes changes in micronutrient content and flavour-related compounds of raw meat and dry-cured leg (Fenalår). *Foods*. 2022;11(7):1043. <https://doi.org/10.3390/foods11071043>
22. Paulíková I, Kováč G, Bíris J, Paulík S, Seidel H, Nagy O. Iodine toxicity in ruminants. *Veterinární medicína*. 2002;47(12):343–350. <https://doi.org/10.17221/5845-VETMED>
23. Huszenicza GY, Kulcsar M, Rudas P. Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Veterinární medicína*. 2002;47(7):199–210. <https://doi.org/10.17221/5824-VETMED>

24. Makkar HPS, Tran G, Haузé V, Giger-Reverdin S, Lessire M, Lebas F, *et al.* Seaweeds for livestock diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2016;212:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.018>
25. Antaya NT, Ghelichkhan M, Pereira ABD, Soder KJ, Brito AF. Production, milk iodine, and nutrient utilization in Jersey cows supplemented with the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (kelp meal) during the grazing season. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(9):8040–8058. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16478>
26. Silva LHP, Reis SF, Melo ATO, Jackson BP, Brito AF. Supplementation of *Ascophyllum nodosum* meal and monensin: Effects on diversity and relative abundance of ruminal bacterial taxa and the metabolism of iodine and arsenic in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2022;105(5):4083–4098. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21107>
27. MacDonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of Nutrition*. 2000;130(5):1500S–1508S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>
28. Engle TE. Effects Of Mineral Nutrition of Immune Function and Factors That Affect Trace Mineral Requirements of Beef Cattle. Wyoming: University of Nebraska; 2001. 87 p.
29. López-Alonso M. Trace minerals and livestock: not too much not too little. *International Scholarly Research Notices*. 2012;2012(1):704825. <https://doi.org/10.5402/2012/704825>
30. Spears JW. Trace mineral bioavailability in ruminants. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(5):1506S–1509S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1506S>
31. Cao J, Henry PR, Guo R, Holwerda RA, Toth JP, Littell RC, *et al.* Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *Journal of Animal Science*. 2000;78(8):2039–2054. <https://doi.org/10.2527/2000.7882039x>
32. Gunter SA, Malcolm-Callis KJ, Duff GC, Kegley EB. Performance of steers supplemented with zinc during grazing and receiving at the feedlot. *The Professional Animal Scientist*. 2001;17(4):280–286. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31641-7](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31641-7)
33. Froetschel MA, Martin AC, Amos HE, Evans JJ. Effects of zinc sulfate concentration and feeding frequency on ruminal protozoal numbers, fermentation patterns and amino acid passage in steers. *Journal of Animal Science*. 1990;68(9):2874–2884. <https://doi.org/10.2527/1990.6892874x>
34. Krasnoslobodtseva AS, Shulaev GM. Efficiency of application of preparations “Iodis-Concentrate” in complex with “DAFS-25” in diets of heifers. *Tambov University Reports. Series: Natural and Technical Sciences*. 2009;14(1):125–127. (In Russ.). [Краснослободцева А. С., Шулаев Г. М. Эффективность применения препаратов «Йодис-концентрат» в комплексе с «ДАФС-25» в рационах телок // Вестник Тамбовского университета. Серия: естественные и технические науки. 2009. Т. 14. № 1. С. 125–127.]. <https://elibrary.ru/KXFWIV>
35. Berestov DS, Merzlyakova EA, Troshin EI. Antioxidant effect of DAFS-25 on fattening bulls and preventing the effects of radiation exposure. *Russian Journal of Veterinary Pathology*. 2007;(1):188–192. (In Russ.). [Берестов Д. С., Мерзлякова Е. А., Трошин Е. И. Антиоксидантный эффект ДАФС-25 при откорме бычков и в профилактике последствий лучевого воздействия. Ветеринарная патология. 2007. № 3. С. 188–192.]. <https://elibrary.ru/OFNABB>
36. Hofstee P, McKeating DR, Bartho LA, Anderson ST, Perkins AV, Cuffe JSM. Maternal selenium deficiency in mice alters offspring glucose metabolism and thyroid status in a sexually dimorphic manner. *Nutrients*. 2020;12(1):267. <https://doi.org/10.3390/nu12010267>
37. Zhang F, Teng Z, Wang L, Wang L, Huang T, Zhang X. Dietary selenium deficiency and excess accelerate ubiquitin-mediated protein degradation in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via Akt/FoxO3a and NF-κB signaling pathways. *Biological Trace Element Research*. 2021;200:1361–1375. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02726-x>
38. Xu J, Wang L, Tang J, Jia G, Liu G, Chen X, Cai J, *et al.* Pancreatic atrophy caused by dietary selenium deficiency induces hypoinsulinemic hyperglycemia via global down-regulation of selenoprotein encoding genes in broilers. *PLoS ONE*. 2017;12(8):e0182079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182079>
39. Arshad MA, Ebeid HM, Hassan FU. Revisiting the effects of different dietary sources of selenium on the health and performance of dairy animals: A review. *Biological Trace Element Research*. 2021;199:3319–3337. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02480-6>
40. Hadrup N, Ravn-Haren G. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of oral selenium from organic and inorganic sources: A review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2021;67:126801. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126801>
41. Fakhrolmobasheri M, Nasr-Esfahany Z, Khanahmad H, Zeinalian M. Selenium supplementation can relieve the clinical complications of COVID-19 and other similar viral infections. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2021;91(3-4):197–199. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000663>
42. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, *et al.* Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*. 2020;582:289–293. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
43. Lee MRF, Fleming HR, Cogan T, Hodgson C, Davies DR. Assessing the ability of silage lactic acid bacteria to incorporate and transform inorganic selenium within laboratory scale silos. *Animal Feed Science and Technology*. 2019;253:125–134. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.05.011>

44. He L, Zhao J, Wang L, Liu Q, Fan Y, Li B, et al. Using nano-selenium to combat Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)? Nano Today. 2021;36:101037. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101037>
45. Arce-Cordero JA, Monteiro HF, Lelis AL, Lima LR, Restelatto R, Brandao VLN, et al. Copper sulfate and sodium selenite lipid-microencapsulation modifies ruminal microbial fermentation in a dual-flow continuous-culture system. Journal of Dairy Science. 2020;103(8):7068–7080. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17913>
46. Galbraith ML, Vorachek WR, Estill CT, Whanger PD, Bobe G, Davis TZ, et al. Rumen microorganisms decrease bioavailability of inorganic selenium supplements. Biological Trace Element Research. 2016;171:338–343. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0560-8>
47. Zhang R, Zhu W, Zhu W, Liu J, Mao S. Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014;94(9):1886–1895. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6508>
48. Liu K, Zhang Y, Yu Z, Xu Q, Zheng N, Zhao S, et al. Ruminal microbiota–host interaction and its effect on nutrient metabolism. Animal Nutrition. 2021;7(1):49–55. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.12.001>
49. Söllinger A, Tveit AT, Poulsen M, Noel SJ, Bengtsson M, Bernhardt J, et al. Holistic assessment of rumen microbiome dynamics through quantitative metatranscriptomics reveals multifunctional redundancy during key steps of anaerobic feed degradation. Msystems. 2018;3(4):e00038-18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00038-18>
50. Wu S, Cui Z, Chen X, Zheng L, Ren H, Wang D, et al. Diet-ruminal microbiome-host crosstalk contributes to differential effects of calf starter and alfalfa hay on rumen epithelial development and pancreatic  $\alpha$ -amylase activity in yak calves. Journal of Dairy Science. 2021;104(4):4326–4340. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18736>
51. Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Screening for and identification of Starch-, Amylopectin-, and Pullulan-Degrading activities in bifidobacterial strains. Applied and Environmental Microbiology. 2006;72(8):5289–5296. <https://doi.org/10.1128/AEM.00257-06>
52. Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. Genes Nutrition. 2011;6:285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
53. Hernández R, De Mares MC, Jimenez H, Reyes A, Caro-Quintero A. Functional and phylogenetic characterization of bacteria in bovine rumen using fractionation of ruminal fluid. Frontiers in Microbiology. 2022;13:813002. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.813002>
54. Zhang K. Research Gi Development and Rumen Microbiome From 0 to 56-day-ole at Cashmere Goat. 2017.
55. Sun L, Jia H, Li J, Yu M, Yang Y, Tian D, et al. Cecal gut microbiota and metabolites might contribute to the severity of acute myocardial ischemia by impacting the intestinal permeability, oxidative stress, and energy metabolism. Frontiers in Microbiology 2019;10:1745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01745>
56. Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, et al. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. FEMS Microbiology Ecology. 2013;83(2):504–514. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12011>
57. Qiu X, Qin X, Chen L, Chen Z, Hao R, Zhang S, et al. Serum biochemical parameters, rumen fermentation, and rumen bacterial communities are partly driven by the breed and sex of cattle when fed high-grain diet. Microorganisms. 2022;10(2):323. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020323>
58. Liu YJ, Wang C, Liu Q, Guo G, Huo WJ, Zhang YL, et al. Effects of sodium selenite addition on ruminal fermentation, microflora and urinary excretion of purine derivatives in Holstein dairy bulls. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2019;103(6):1719–1726. <https://doi.org/10.1111/jpn.13193>
59. Mao SY, Huo WJ, Zhu WY. Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goat model. Environmental Microbiology. 2016;18(2):525–541. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12724>
60. Purushe J, Fouts DE, Morrison M, White BA, Mackie RI, Coutinho PM, et al. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: insights into their environmental niche. Microbial Ecology. 2010;60:721–729. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9692-8>
61. Rubino F, Carberry C, Waters SM, Kenny D, McCabe MS, Creevey CJ. Divergent functional isoforms drive niche specialisation for nutrient acquisition and use in rumen microbiome. International Society for Microbial Ecology Journal. 2017;11(4):932–944. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.34>
62. Deusch S, Camarinha-Silva A, Conrad J, Beifuss U, Rodehutsord M, Seifert J. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. Frontiers in Microbiology. 2017;8:1605. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01605>
63. He Z, Ma Y, Chen X, Liu S, Xiao J, Wang Y, et al. Protective effects of intestinal gallic acid in neonatal dairy calves against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing enteroaggregative *Escherichia coli* infection: modulating intestinal homeostasis and colitis. Frontiers in Nutrition. 2022;9:864080. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.864080>
64. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhan R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. Cell. 2014;159(4):789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>

65. Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order *Clostridiales*, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012;62(1):144–149. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.026989-0>
66. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505:559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
67. Manor O, Zubair N, Conomos MP, Xu X, Rohwer JE, Krafft CE, et al. A Multi-omic Association Study of Trimethylamine N-Oxide. *Cell reports*. 2018;24(4):935–946. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.096>
68. Huang C, Ge F, Yao X, Guo X, Bao P, et al. Microbiome and Metabolomics Reveal the Effects of Different Feeding Systems on the Growth and Ruminant Development of Yaks. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:682989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682989>
69. Kittelmann S, Seedorf H, Walters WA, Clemente JC, Knight R, Gordon JI, et al. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS One*. 2013;8(2):e47879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047879>
70. Haas KN, Blanchard JL *Kineothrix alysoides*, gen. nov., sp. nov., a saccharolytic butyrate-producer within the family *Lachnospiraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017;67(2):402–410. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001643>
71. Xu H, Collins JF, Bai L, Kiela PR, Lynch RM, Ghishan FK. Epidermal growth factor regulation of rat NHE2 gene expression. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2001;281(2):C504–C513. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.2.C504>
72. Bekele AZ, Koike S, Kobayashi Y. Phylogenetic diversity and dietary association of rumen *Treponema* revealed using group-specific 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;316(1):51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02191.x>
73. Nyonyo T, Shinkai T, Mitsumori M. Improved culturability of cellulolytic rumen bacteria and phylogenetic diversity of culturable cellulolytic and xylanolytic bacteria newly isolated from the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;88(3):528–537. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12318>
74. Zhao C, Li Y, Chen Q, Guo Y, Sun B, Liu D. Effect of organic acids on fermentation quality and microbiota of horseshoe residue and corn protein powder. *AMB Express*. 2024;14:58. <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01686-4>
75. Ransom-Jones E, Jones DL, McCarthy AJ, McDonald JE. The *Fibrobacteres*: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microbiology Ecology*. 2012;63:267–281. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9998-1>
76. Béra-Maillet C, Mosoni P, Kwasiński A, Suau F, Ribot Y, Forano E. Development of a RT-qPCR method for the quantification of *Fibrobacter succinogenes* S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *Journal of Microbiological Methods*. 2009;77(1):8–16. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.009>
77. Karami A, Sarshar M, Ranjbar R, Zanjani RS. The Phylum Spirochaetaceae. In: Rosenberg E, editor. *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Germany: Springer Berlin Heidelberg. 2014. pp. 915–929.
78. Savin KW, PJ Moate, Williams SRO, Bath C, Hemsworth J, Wang J, et al. Dietary wheat and reduced methane yield are linked to rumen microbiome changes in dairy cows. *PLoS One*. 2022;17(5):e0268157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268157>
79. Kamke J, Kittelmann S, Soni P, Li Y, Tavendale M, Ganesh S, et al. Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a *Sharpea*-enriched microbiome characterised by lactic acid formation and utilisation. *Microbiome*. 2016;4:56. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0201-2>
80. Yi S, Dai D, Wu H, Chai S, Liu S, Meng Q, et al. Dietary Concentrate-to-Forage Ratio Affects Rumen Bacterial Community Composition and Metabolome of Yaks. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:927206. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.927206>
81. Wang C, Xu Y, Han L, Liu Q, Guo G, Huo W, et al. Effects of zinc sulfate and coated zinc sulfate on lactation performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows. *Livestock Science*. 2021;251:104673. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104673>
82. Ishaq SL, Page CM, Yeoman CJ, Murphy TW, Van Emon ML, Stewart WC. Zinc AA supplementation alters yearling ram rumen bacterial communities but zinc sulfate supplementation does not. *Journal of Animal Science*. 2019;97(2):687–697. <https://doi.org/10.1093/jas/sky456>
83. Du HS, Wang C, Wu ZZ, Zhang GW, Liu Q, Guo G, et al. Effects of rumen-protected folic acid and rumen-protected sodium selenite supplementation on lactation performance, nutrient digestion, ruminal fermentation and blood metabolites in dairy cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(13):5826–5833. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9853>
84. Liu H, Xu T, Xu S, Ma L, Han X, Wang X, et al. Effect of dietary concentrate to forage ratio on growth performance, rumen fermentation and bacterial diversity of Tibetan sheep under barn feeding on the Qinghai-Tibetan plateau. *Peer Journal*. 2019;7:e7462. <https://doi.org/10.7717/peerj.7462>
85. Miltko R, Rozbicka-Wieczorek JA, Wiesyk E, Czuderna M. The influence of different chemical forms of selenium added to the diet including carnosic acid, fish oil and rapeseed oil on the formation of volatile fatty acids and methane in the rumen, and fatty acid profiles in the rumen content and muscles of lambs. *Acta Veterinaria*. 2016;66(3):373–391. <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0032>

86. Shahid A, Moolchand M, Soomro SA, Giasuddin SM, Kalhoro NH, Kaka A, et al. Influence of dietary selenium yeast supplementation on fermentation pattern, papillae morphology and antioxidant status in rumen of goat. *Pakistan Journal of Zoology*. 2020;52(2):565–571. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20190205120240>
87. Liu YJ, Zhang ZD, Dai SH, Wang Y, Tian XF, Zhao JH, et al. Effects of sodium selenite and coated sodium selenite addition on performance, ruminal fermentation, nutrient digestibility and hepatic gene expression related to lipid metabolism in dairy bulls. *Livestock Science*. 2020;237:104062. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104062>
88. Samo SP, Malhi M, Gadahi J, Lei Y, Kaciwal AB, Soomro SA. Effect of organic selenium supplementation in diet on gastrointestinal tract performance and meat quality of goat. *Pakistan Journal of Zoology*. 2018;50(3):995–1001. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.3.995.1003>
89. Ye X, Zhou L, Zhang Y, Xue S, Gan QF, Fang S. Effect of host breeds on gut microbiome and serum metabolome in meat rabbits. *BMC Veterinary Research*. 2021;17:24. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02732-6>
90. Wu I-W, Lee C-C, Hsu H-J, Sun C-Y, Chen Y-C, Yang K-J, et al. Compositional and functional adaptations of intestinal microbiota and related metabolites in CKD patients receiving dietary protein restriction. *Nutrients*. 2020;12(9):2799. <https://doi.org/10.3390/nul12092799>
91. Zhu W, Yan J, Zhi C, Zhou Q, Yuan X. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> deficiency-induced gut microbial dysbiosis degrades the colonic mucus barrier in *Cyp27b1* knockout mouse model. *Gut Pathogens*. 2019;11:8. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0291-z>
92. Ricci S, Pacifico C, Castillo-Lopez E, Rivera-Chacon R, Schwartz-Zimmermann HE, Reisinger N, et al. Progressive microbial adaptation of the bovine rumen and hindgut in response to a step-wise increase in dietary starch and the influence of phytogetic supplementation. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:920427. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.920427>
93. Pacifico C, Petri RM, Ricci S, Mickdam E, Wetzels SU, Neubauer V, et al. Unveiling the Bovine Epimural Microbiota Composition and Putative Function. *Microorganisms*. 2021;9(2):342. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020342>
94. Hackmann TJ, Firkins JL. Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00465>
95. Tsuchiya Y, Chiba E, Kimura A, Kawashima K, Hasunuma T, Kushibiki S, et al. Predicted functional analysis of rumen microbiota suggested the underlying mechanisms of the postpartum subacute ruminal acidosis in Holstein cows. *Journal of Veterinary Science*. 2023;24(2):e27. <https://doi.org/10.4142/jvs.22246>
96. Weiss B. Effect of supplemental biotin on performance of lactating dairy cows. *Proceedings DIGAL Conference*. Chihuahua Mexico: Delicias; 2001. 7–17.
97. Streit WR, Entcheva P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;61:21–31. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1186-2>
98. Hayashi A, Mikami Y, Miyamoto K, Kamada N, Sato T, Mizuno S, et al. Intestinal dysbiosis and biotin deprivation induce alopecia through overgrowth of *Lactobacillus murinus* in mice. *Cell Reports*. 2017;20:1513–1524. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.057>
99. Colagiorgi A, Turrone F, Mancabelli L, Serafini F, Secchi A, van Sinderen D, et al. Insights into teichoic acid biosynthesis by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *FEMS Microbiology Letters*. 2015;362(17):fnnv141. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnnv141>
100. Garcia M, Bradford BJ, Nagaraja TG. Invited review: ruminal microbes, microbial products, and systemic inflammation. *The Professional Animal Scientists*. 2017;33(6):635–650. <https://doi.org/10.15232/pas.2017-01663>
101. Lu X, Ce Q, Jin L, Zheng, J, Sun M, Tang X, et al. Deoiled sunflower seeds ameliorate depression by promoting the production of monoamine neurotransmitters and inhibiting oxidative stress. *Food and Function*. 2021;12(2):573–586. <https://doi.org/10.1039/D0FO01978J>
102. Mao SY, Zhang RY, Wang DS, Zhu WY. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe*. 2013;24:12–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.08.003>
103. Liu Q, Zhang Y, Zhang J, Du Z, He B, Qin J, et al. Organic Iodine Improves the Growth Performance and Gut Health of Fujian Yellow Rabbits. *Animals*. 2024;14(13):935. <https://doi.org/10.3390/ani14131935>
104. Mehri A. Trace elements in human nutrition (II)—An update. *International Journal of Preventive Medicine*. 2020;11:2. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_48\\_19](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19)
105. Hilal EY, Elkhairy MAE, Osman AOA. The role of zinc, manganese and copper in rumen metabolism and immune function: a review article. *Open Journal of Animal Sciences*. 2016;6:304–324. <https://doi.org/10.4236/ojas.2016.64035>
106. Miller WJ. Zinc nutrition of cattle: a review. *Journal of Dairy Science*. 1970;53(8):1123–1135. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86355-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86355-X)
107. Ma L, Terwilliger A, Maresso AW. Iron and zinc exploitation during bacterial pathogenesis. *Metallomics*. 2015;7(12):1541–1554. <https://doi.org/10.1039/c5mt00170f>
108. McDevitt CA, Ogunniyi AD, Valkov E, Lawrence MC, Kobe B, McEwan AG, et al. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathogens*. 2011;7(11):e1002357. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002357>

109. Kwak WS, Kim YI, Choi DY, Lee YH. Effect of feeding mixed microbial culture fortified with trace minerals on ruminal fermentation, nutrient digestibility, nitrogen and trace mineral balance in sheep. *Journal of Animal Science and Technology*. 2016;58:21. <https://doi.org/10.1186/s40781-016-0102-8>
110. Lee MRF, Fleming HR, Whittington F, Hodgson C, Suraj PT, Davies DR. The potential of silage lactic acid bacteria-derived nano-selenium as a dietary supplement in sheep. *Animal Production Science*. 2019;59(11):1999–2009. <https://doi.org/10.1071/AN19258>
111. Romero-Pérez A, García-García E, Zavaleta-Mancera A, Ramírez-Briebesca JE, Revilla-Vázquez A, Hernández-Calva LM, *et al.* Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles *in vitro* to improve selenium absorption in ruminants. *Veterinary Research Communications*. 2010;34:71–79. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9335-z>
112. Grabez V, Coll-Brasas E, Fulladosa E, Hallenstvedt E, Håseth TT, Øverland M, *et al.* Seaweed inclusion in finishing lamb diet promotes changes in micronutrient content and flavour-related compounds of raw meat and dry-cured leg (Fenalår). *Foods*. 2022;11(7):1043. <https://doi.org/10.3390/foods11071043>
113. Hendawy AO, Khattab MS, Sugimura S, Sato K. Effects of 5-aminolevulinic acid as a supplement on animal performance, iron status, and immune response in farm animals: A review. *Animals*. 2020;10(8):1352. <https://doi.org/10.3390/ani10081352>
114. Li X, Højberg O, Canibe N, Jensen BB. Phylogenetic diversity of cultivable butyrate-producing bacteria from pig gut content and feces. *Journal of Animal Science*. 2016;94(3):377–381. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9868>
115. Makkar HPS, Tran G, Hauzé V, Giger-Reverdin S, Lessire M, Lebas F, Ankers P. Seaweeds for livestock diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2016;212:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.018>
116. NRC (National Research Council) Nutrient Requirements of Beef Cattle. 8th Revised Edition. Washington, DC: National Academies Press. 2015.
117. Giro TM, Kulikovskiy AV, Giro AV. Effect of Essential Microelements on Proteomic Profile of Lamb Muscle Tissue Protein. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(2):396–403. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-2-2443>
118. Giro TM, Ilina LA, Kulikovskiy AV, Ziruk IV, Giro AV. Molecular genetic studies of microbiocenosis and microstructure of jejunum wall in young rams grown on biofortified feed additives. *Foods and Raw Materials*. 2022;10(2):310–317. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-2-541>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2545>  
<https://elibrary.ru/GNHION>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Аргументированный выбор основных направлений в работе со штаммом *Limnospira fusiformis* из озера Соленого (г. Омск)



Е. А. Молибога<sup>1,\*</sup>, В. В. Леушкина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Омский государственный технический университет , Омск, Россия

<sup>2</sup> Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина , Омск, Россия

Поступила в редакцию: 31.01.2024

Принята после рецензирования: 22.03.2024

Принята к публикации: 02.04.2024

\*Е. А. Молибога: [mea130980@mail.ru](mailto:mea130980@mail.ru),

<https://orcid.org/0000-0001-7226-5962>

В. В. Леушкина: <https://orcid.org/0000-0003-2286-8612>

© Е. А. Молибога, В. В. Леушкина, 2024



### Аннотация.

В условиях разнообразия товарного ассортимента продуктов питания потребитель становится требовательным к их выбору, уделяя внимание их функциональности и доступности по ценовой категории. На продовольственном рынке появляется все больше продуктов на основе альтернативных источников белка, например, микроводоросль спирулина. Микроводоросли богаты белком (около 60 %), ненасыщенными жирными кислотами, а также другими питательными веществами. Цель исследования – изучить потребительские предпочтения населения г. Омска относительно спирулиносодержавшей продукции для определения вектора работы с фитомассой *Limnospira fusiformis*.

Объект исследования – спирулиносодержавшая продукция, присутствующая на потребительском рынке г. Омска и Омской области. В работе использовали исследовательские и маркетинговые методы. Проведен маркетинговый опрос, в котором участвовали 1000 респондентов.

Анализ полученных данных показал, что 19,2 % респондентов стабильно употребляют спирулиносодержавшую продукцию; 20,8 % – раз в неделю. 79,2 % респондентов ответили, что приобретают ее в виде БАД. В основу выбора ставят состав и сертификационные данные 58,4 % респондентов, заботу о здоровье – 75,3 %. Наилучшим способом приобретения выбраны онлайн-платформы – 48,1 % опрошенных; запрос по ценовой политике продукта был обозначен у 42,9 % респондентов. В результате проведенного исследования авторами выбран оптимальный план дальнейшей работы: введение в оборот информационно-просветительской информации о БАД; разработка и утверждение научно-технической документации на данную продукцию; проектирование технико-экономических показателей производства; проведение расчетов себестоимости вводимого на рынок продукта с возможной оптимизацией технологического процесса производства.

Результаты маркетингового исследования позволили выявить виды социально-экономического эффекта от внедрения спирулиносодержавшей продукции, такие как экономический, социальный, экологический, научный, ресурсный, бюджетный. Определены два основных портрета потребителей спирулиносодержавшей продукции Омской области, с помощью которых намечены основные рекомендации для промышленных производителей спирулиносодержавшей продукции.

**Ключевые слова.** *Limnospira fusiformis*, фитомасса, пищевая добавка, спирулиносодержавшая продукция, белок, маркетинговые исследования, региональный рынок

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда  № 22-26-20108.

**Для цитирования:** Молибога Е. А., Леушкина В. В. Аргументированный выбор основных направлений в работе со штаммом *Limnospira fusiformis* из озера Соленого (г. Омск) // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 872–883. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2545>

## ***Limnospira fusiformis* from Lake Solenoe, Omsk: Rationalizing Marketing and Research**



**Elena A. Moliboga<sup>1,\*</sup>**, **Viktoriya V. Leushkina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Omsk State Technical University<sup>ROR</sup>, Omsk, Russia

<sup>2</sup> Omsk State Agrarian University<sup>ROR</sup>, Omsk, Russia

Received: 31.01.2024  
Revised: 22.03.2024  
Accepted: 02.04.2024

\*Elena A. Moliboga: [mea130980@mail.ru](mailto:mea130980@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-7226-5962>

Viktoriya V. Leushkina: <https://orcid.org/0000-0003-2286-8612>

© E.A. Moliboga, V.V. Leushkina, 2024



### **Abstract.**

A diverse food product range makes the consumer more demanding and pickier in terms of choice, safety, and price. As a result, food producers turn to alternative protein sources, such as microalgae. Microalgae are rich in protein (60%), unsaturated fatty acids, and other nutrients. The article describes the consumer preferences and patterns in the city of Omsk, Russia, regarding spirulina-containing products. The research objective was to determine the marketing and research prospects for *Limnospira fusiformis* phytomass.

The authors used both experimental and marketing methods to study the range of spirulina-containing products on the food market of Omsk and its surroundings. The marketing survey involved 1000 Omsk residents.

According to the survey, 19.2% bought spirulina-containing products regularly; 20.8% bought them at least once a week; 79.2% consumed spirulina as dietary supplements. The respondents explained their choice by the composition and certification data (58.4%), as well as by health care reasons (75.3%); 48.1% preferred online platforms; 42.9% studied the pricing policy before purchasing. The survey revealed two distinct profiles of an average spirulina consumer. The resulting roadmap for spirulina marketing in the Omsk Region included the following steps: promotion; scientific and technical documentation; technical and economic production indicators; pricing; technological optimization.

The marketing research revealed a number of socio-economic effects of introducing spirulina products to the local food market, which included economic, social, environmental, scientific, resource, and budgetary consequences. The two profiles of an average spirulina consumer from the Omsk Region made it possible to develop some recommendations for local spirulina producers and businesses.

**Keywords.** *Limnospira fusiformis*, phytomass, food additive, spirulina-containing products, protein, marketing research, regional market

**Funding.** The research was supported by the Russian Science Foundation<sup>ROR</sup>, grant No. 22-26-20108.

**For citation:** Moliboga EA, Leushkina VV. *Limnospira fusiformis* from Lake Solenoe, Omsk: Rationalizing Marketing and Research. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):872–883. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2545>

### **Введение**

В настоящее время человечество испытывает воздействие нескольких крупных проблем, так называемых глобальных вызовов, заставляющих искать новые пути их разрешения для устойчивого развития цивилизации. Одна из главных мировых проблем – дефицит продовольствия. Ведущие международные эксперты предупреждают, что проблема с голодом грозит обостриться и последствия могут быть крайне тяжелыми. Поставленная ООН цель в области устойчивого развития – ликвидация голода к 2030 г. – отдалилась еще сильнее. Соблюдение диеты с высоким содержанием белка, удовлетворяющей потребности человека в питании, – глобальная проблема, которая постоянно

усугубляется из-за роста населения мира. Распределение продуктов питания уже сейчас неравномерно, и около 11 % людей страдают от недоедания. Основным поставщиком белка является животноводческая отрасль, которая загрязняет окружающую среду за счет выбросов парниковых газов. В связи с этим существует острая потребность в поисках альтернативных источников белка, которые можно легко и быстро производить в больших количествах, но при этом не оказывая серьезного воздействия на мировые экосистемы и климат.

Таким источником является микроводоросль спирулина. Во многих странах она уже успешно используется для борьбы с недоеданием. Для западноевропей-

ского продовольственного рынка спирулина интересна прежде всего как альтернатива общепринятым источникам животного белка, но при этом до сих пор она мало изучена. Микроводоросли богаты белком (около 60 %), ненасыщенными жирными кислотами, содержат и другие полезные вещества, такие как гамма-линоленовая кислота и бета-каротиноиды [1].

На сегодняшний день недостаточно изучена пищевая ценность продукции с внесением спирулины. Акценты производителей направлены на изучение сенсорных показателей и текстурно-реологических свойств продукции. Разработаны способы контроля желаемой текстуры будущих продуктов на основе спирулины. В Геттингенском университете изучили возможность применения спирулины в качестве альтернативного ингредиента в технологии пищевых продуктов, которые по текстуре напоминали бы мясо (например, соевые котлеты, стейки или наггетсы). Показано, что смесь спирулины и сои пригодна для экструзии и может достигать волокнистой мясной текстуры. В результате готовые продукты с более высоким содержанием спирулины имели более отчетливый вкус водорослей, что следует учитывать при дальнейшей разработке продукта [2].

Спирулина преимущественно культивируется в резервуарах, поэтому ее производство не зависит от местных почвенных условий. В последние годы в Европе было открыто несколько ферм для выращивания микроводорослей, однако большее ее количество по-прежнему производится в Азии [3, 4].

Сегодня существует потребность не только в производстве спирулиносодержащей продукции, но и в проведении анализа готовности и возможности потребителей покупать ее, а также в каком виде. Необходимо проведение маркетинговых исследований для сбора информации о рынке, потребностях потребителей, их предпочтениях, интересах, тенденциях рынка, последствиях выведения на российский рынок новинок спирулиносодержащей продукции. Изучение целевого рынка новой продукции играет ключевую роль для исследователей, поскольку позволяет выявить особенности потребностей или отсутствие интереса целевой аудитории к инновационным продуктам питания [6].

Маркетинговые исследования можно определить как систематический и объективный процесс сбора, генерации, анализа и интерпретации информации и передачи ее для принятия решения о выходе на рынок с новой продукцией. Маркетинговое исследование – это, скорее, специальное усилие, чем случайная попытка собрать информацию. Ориентирование на потребителя – основная цель любого производства. Это делается с помощью постоянных процессов обратной связи с потребителями и контроля, бета-тестирования и экспертных интервью, направленных на повышение вероятности успеха нового продукта на рынке и его принятия потребителями.

В ходе интервью с экспертами в области пищевых продуктов обсуждались различные идеи, связанные с экструдатами водорослей. Еще до фактического производства продуктов был проведен онлайн-опрос, чтобы выяснить, какие продукты, по мнению потребителей, являются наиболее перспективными. Макароны с начинкой в качестве основного продукта, суши со спирулиной, приготовленные по принципу сочетания вкусов, и веганская альтернатива вяленому мясу были представлены потребителям на фотографиях. Было рассмотрено, какое сочетание продукта и маркетинговой стратегии может вызвать наибольшее признание. Этот шаг позволил конечным потребителям оценить идеи на раннем этапе, еще до того, как ресурсы были направлены на фактическую разработку продукта [5]. Потребители предпочитали макароны с начинкой из спирулины двум другим категориям [2]. И наоборот, все три продукта, содержащие спирулину, были бы предпочтительны, если бы они были одинаково хорошо известны потребителям. Что касается маркетинговых возможностей, основанных на преимуществах устойчивости, здоровья и инноваций, было показано, что полезные продукты пользуются большим спросом [2].

Таким образом, микроводоросль спирулина может быть представлена в составе пищевых продуктов. С точки зрения производства пищевой продукции и ожиданий потребителей, тенденции направлены на снижение потребления мясных продуктов и увеличение доли растительного белка в рационе человека за счет водорослей.

Продукты на основе альтернативных источников белка, таких как спирулина, могут быть внедрены повсеместно только в том случае, если они будут востребованы потребителями, тем самым стимулируя производителей продуктов питания с экономической точки зрения. Для успешного вывода продуктов из спирулины на рынок необходимо определить наиболее подходящие группы потребителей (с максимальной ценовой готовностью).

Так, в Германии в 2020 г. был проведен опрос с участием 176 человек. Респонденты имели уровень образования выше среднего, доход выше среднего, а средний возраст был чуть ниже среднего по стране. Выборка была распределена по районам. В ходе проведенного опроса было установлено, что суши являются самым дорогим продуктом, за ними следуют макароны, а затем вяленое мясо. Это свидетельствует о том, что респонденты не способны точно оценить стоимость, однако могут самостоятельно распределять продукты по ценовым категориям без необходимости их сравнения. Исследования также показали, что на готовность потребителей к определенной цене влияют такие значимые факторы, как возраст, происхождение и стиль питания. Уровень образования дает возможность делать выводы в определенных пределах. Отмечено, что между имеющимися знаниями о спирулине и готовностью потребителей платить

за нее не наблюдается никакой связи. Следовательно, предыдущий опыт потребления спирулины не служит критерием для принятия инновационных продуктов, что может упростить процесс маркетинга. Ожидается, что к 2027 г. рынок спирулины будет расти с годовым темпом роста 10,3 % [1, 6].

Прогнозируется, что российский рынок спирулины будет расти с CAGR около 9,5 % в течение прогнозируемого периода, т. е. в 2022–2027 гг. В рамках отчета MarkNtel Advisors рынок был разделен на различные сегменты: доля рынка, потребление, производство, привлекательность и другие соответствующие данные, которые используются для анализа исследуемых сегментов рынка. Выявлено, что потребители предпочитают спирулину в виде порошка, таблеток и жидкости, но готовы покупать еду и напитки, содержащие спирулину, в частности кондитерские изделия и иные обработанные пищевые продукты [7]. В отчете по исследованию мирового рынка спирулины с прогнозом на 2023–2028 гг. были выделены ключевые регионы, где наблюдается наибольшее ее потребление: Северная и Южная Америка, Европа, Ближний Восток и Африка, а также Азиатско-Тихоокеанский регион. Среди стран с высоким уровнем потребления спирулины можно выделить США, Канаду, Мексику, Бразилию, Аргентину, Германию, Великобританию, Францию, Италию, Испанию, Россию, Турцию, Саудовскую Аравию, Южную Африку, Китай, Индию, Японию и Австралию [7].

Сложившаяся мировая ситуация требует поиска альтернативных источников продовольствия, относящихся к возобновляемым биоресурсам [8–10]. Кроме традиционной продукции сельского хозяйства и рыбного промысла, пристальное внимание уделяется изучению пищевой ценности микроводорослей, среди которых одно из первых мест занимают нитчатые цианопрокарियोты родов *Arthrospira* Sitzenberger ex Gomont 1892 и *Limnospira* Nowicka-Krawczyk, Mühlstejnová et Hauer 2019 [11]. Эти водоросли широко распространены в различных водоемах по всему миру, преимущественно в странах с теплым климатом [12–14]. Питательная ценность этих видов цианопрокарियोт известна с древних времен. В настоящее время они широко используются во всем мире как диетический продукт, биологически активная добавка к пище, входят в состав косметических и лечебно-профилактических препаратов, а также могут использоваться для получения биотоплива [12, 13, 15–24]. Помимо своих питательных свойств, водоросли *Arthrospira* и *Limnospira* обладают терапевтическим [16, 25–27] и промышленным потенциалом [22, 24, 28, 29]. В развитых странах водоросли получили широкое распространение в основных продуктах питания (мясо, хлебобулочные изделия, молочная продукция), особенно у потребителей, которые ведут здоровый образ жизни.

В России ведущие производители продукции на основе спирулины расположены в Краснодарском крае, Тверской, Новосибирской и Волгоградской обла-

стях, а также в Перми, Москве, Калининграде и Санкт-Петербурге. Производство ориентировано на создание биологически активных добавок, косметических средств и молочной продукции с применением местных биологических штаммов.

Цель исследования – изучить потребительские предпочтения населения г. Омска относительно спирулиносодержащей продукции для определения вектора работы с фитомассой *Limnospira fusiformis*.

Задачи исследования:

- изучить потребительские предпочтения спирулиносодержащей продукции в повседневной жизни населения г. Омска;
- установить портрет потребителя для продвижения спирулиносодержащей продукции на региональный рынок;
- определить оптимальный вариант ввода продукта в производственный цикл.

### Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлась продукция, содержащая спирулину, которая присутствует в питании жителей г. Омска. Интерес к этому объекту обусловлен существующим научным базисом по технологии выделения монокультуры и культивирования нитчатого цианопрокарियोта *Limnospira fusiformis* штамма O9.13F, добываемого из озера Соленого, расположенного на территории г. Омска, в зоне умеренного климата (юг Западной Сибири). Результатом проведения исследований по разработке технологии культивирования *Limnospira fusiformis* штамма O9.13F из озера Соленого является экологически чистая фитомасса, приемлемая для использования в различных областях промышленности [29]. Основным вопросом исследования являлась возможность введения в продуктовую корзину населения г. Омска продукта с содержанием нового штамма спирулины и определенным набором свойств и качественных характеристик.

В исследовании использовали исследовательские и маркетинговые методы.

В опросе участвовали 1000 жителей г. Омска и Омской области разных половозрастных групп. В работе с респондентами применялся метод удаленного опроса при помощи онлайн-тестирования. Количественное содержание вопросов ограничивалось минимальным значением, чтобы устранить утомляемость и раздражительность респондентов, а также заинтересовать и развить познавательный эффект у местных потребителей к продукции, содержащей спирулину.

На рисунке 1 представлено распределение респондентов по возрастным группам. Преобладающей возрастной группой (31,4 %) в исследовании были респонденты 19–22 лет. По 17,5 % представлены группы респондентов, относящиеся к возрастным категориям 16–18 лет и 51–60 лет. Скорее всего, это можно объяснить наибольшей заинтересованностью респондентов данных возрастных групп в участии в опросах инно-

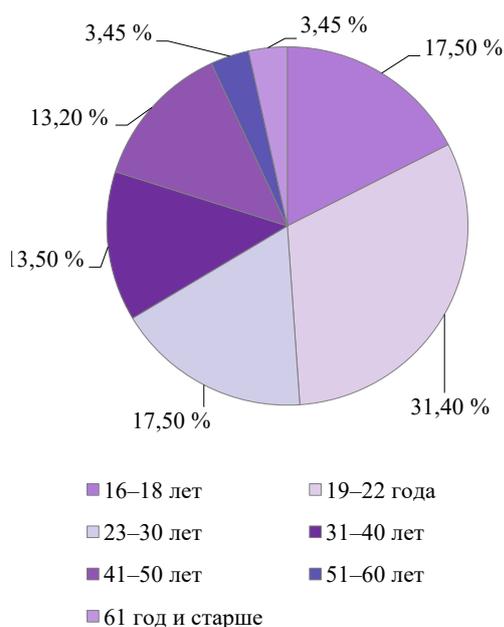


Рисунок 1. Распределение респондентов по возрастным группам

Figure 1. Respondents by age

вационного направления и в решении определенных социально значимых задач города и региона.

По полу респонденты распределились следующим образом: женский – 72,1 %, мужской – 27,9 %. Статистические данные указывают на то, что женщины более лояльно относятся к различного рода опросам. Респонденты отличались по уровню образования. Среднее общее образование имели 26,2 % респондентов; среднее профессиональное – 20 %; высшее – 43,9 %; наличие ученой степени и звания – 10 %.

Опрос проводился в свободном формате, без выявления каких-либо определенных предпочтений по полу, возрасту или наличию высшего образования.

### Результаты и их обсуждение

Первоочередным вопросом в работе с продвижением нового спирулиносодержащего продукта являлся вопрос «Знакомы ли Вы с таким термином как “цианобактерия”, “спирулина”, “спирулиносодержащие продукты”?”. Ответы были распределены достаточно равномерно: «да» ответили 46,4 % респондентов, «нет» – 53,6 %. Полученные данные показали, что населению Омской области терминологические понятия знакомы и ясны, т. е. почти половина целевой аудитории имеет представление о термине «цианобактерия», что идентично термину «спирулина», а часть респондентов заинтересованы в приобретении уже готового продукта. Уровень осведомленности населения о данном виде «компонента или продукта» достаточно высок, что может послужить основой для продвижения спирулиносодержащей продукции на региональном рынке.

На вопрос о приобретении продуктов с содержанием спирулины были получены достаточно конкретные ответы: 80,8 % опрошенных не приобретают продукцию ни в каком виде, 19,2 % являются ее постоянными покупателями. Из результатов видно, что жители г. Омска знакомы с данным компонентом, но не решаются его приобретать в связи с отсутствием знаний о его положительном эффекте и присутствии в определенных продуктах питания. На данном этапе исследований установили основные барьеры в изменении пищевого поведения населения. Работа по популяризации здорового образа жизни, правилах правильного питания, возможных этапах в поддержании иммунного статуса человека спровоцирует изменение в обществе, а именно во вкусовых и пищевых привычках населения. Необходимо детально разбираться во всех сопутствующих элементах питания населения. Именно междисциплинарное взаимодействие технологов пищевых систем и маркетологов позволит сделать определенные шаги в построении стратегических этапов в работе пищевых предприятий.

Полученный результат – 19,2 % респондентов (почти пятая часть опрошенных) являются постоянными потребителями продукции на основе спирулины – может учитываться авторами для усовершенствования существующих разработок в области технологии производства продукции, содержащей спирулину.

При проведении точечного анализа по категориям предпочитаемой спирулиносодержащей продукции (рис. 2) выявлено, что 79,2 % опрошенных предпочитают приобретать данную продукцию в виде лекарственных препаратов (порошки, таблетки, капсулы). Этот выбор достаточно понятен, т. к. идет восприятие данного компонента как средства с лечебным эффектом.

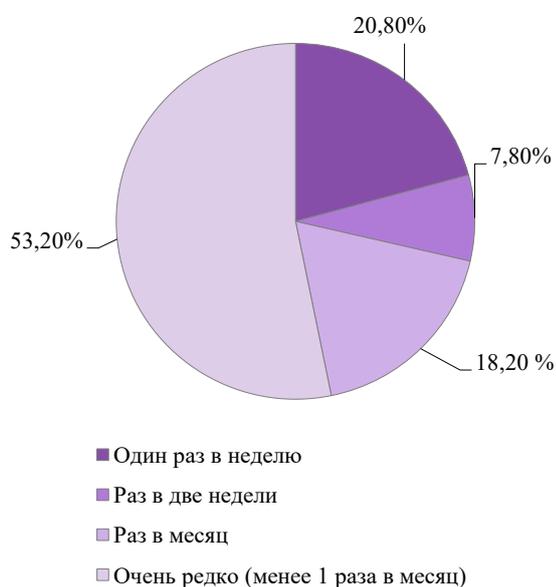
Для анализа предпочитаемой спирулиносодержащей продукции в анкете предложены основные ее виды, которые были определены на основании аналитического обзора производимой в России продукции. Более 11,7 % респондентов отдали предпочтение продукции в замороженном виде. 23,4 % опрошенных предпочитают употреблять молочную спирулиносодержащую продукцию, т. к. считают многокомпонентные продукты более полезными. 18,2 % респондентов выбрали мясную спирулиносодержащую продукцию (недостаточно распространенную на российском рынке). 19,5 % – хлебобулочные спирулиносодержащие продукты без конкретизации вида изделия.

Достаточно интересными ответами на вопрос о частоте приобретения спирулиносодержащей продукции (рис. 3). Менее одного раза в месяц спирулину приобретают 53,2 % опрошенных, один раз в неделю – 20,8 %, раз в месяц – 18,2 %, раз в две недели – 7,8%. Эти результаты подтверждают, что те, кто покупает спирулину в виде БАД, делают это не чаще одного раза в месяц, т. к. упаковка обычно содержит 30–60 капсул. Люди, использующие спирулину как ингредиент в продуктах, покупают ее раз в неделю.



Рисунок 2. Распределение респондентов по категориям предпочитаемой спирулиносодержащей продукции

Figure 2. Respondents by categories of spirulina products



- Один раз в неделю
- Раз в две недели
- Раз в месяц
- Очень редко (менее 1 раза в месяц)

Рисунок 3. Частота приобретения спирулиносодержащей продукции респондентами

Figure 3. Buying patterns: frequency

Для более полной картины исследования важно было проанализировать связь между частотой покупок и доходом на члена семьи. Более 53,2 % респондентов с доходом выше 30 тыс. руб. могут позволить себе покупки БАД. Около 23,4 % респондентов с доходом от 20 до 30 тыс. руб. и 1,3 % с доходом от 10 до 20 тыс. руб. также рассматривают возможность покупки качественных продуктов с функциональными компонентами. Финансовые возможности семьи непосредственно влияют на способность приобретения многокомпонентных продуктов и БАД.

Значимым также является понимание факторов, которые побуждают потребителей к приобретению данной категории товаров. Ответы участников опроса выглядят весьма обоснованными в контексте об-

щего анализа маркетингового исследования. На рисунке 4 представлены основные причины, мотивирующие население к покупке различных видов продукции, содержащей спирулину.

Большая часть опрошенных (75,3 %) приобретают БАД на основе спирулины и выбрали ответ «забота о здоровье», что свидетельствует о заинтересованности населения работать над своим самочувствием, профилактикой каких-либо заболеваний и т. д. 26,0 % опрошенных приобретают продукты со спирулиной лишь из-за интереса к новым продуктам на рынке, 3,9 % респондентов придерживаются вегетарианства. Заинтересованность авторов к ответу «другое» (что составило 18,2 % респондентов) спровоцировало видоизменить конфигурацию задаваемого вопроса для дальнейшего проведения исследования.

После определения основных причин покупок и видов потребляемой продукции, возник вопрос о возможности выделения дополнительных финансовых средств для приобретения продуктов, содержащих спирулину. Важно отметить, что на данном этапе существует значительный барьер в доступе населения к информационно-аналитическим данным. Это приводит к недостаточной осведомленности населения о возможностях поддержания иммунной системы за счет употребления биологически активных веществ и функциональной продукции с определенными качественными характеристиками. В настоящее время исследователи работают над организацией дополнительных мероприятий, акцентируя внимание на ухудшающейся экологической ситуации в регионе, снижении иммунного статуса жителей и растущем уровне стресса. В результате исследований респонденты выразили свои мнения на вопрос «Готовы ли Вы больше тратить на покупку продукции с содержанием спирулины?»: «да» ответили 28,6 %, «нет» – 71,4 %.

По данным Омского здравоохранения, область входит в зону страдающих анемией (нехваткой железа). На основе лабораторно-клинических исследований врачей г. Омска выявлено, что распространенность

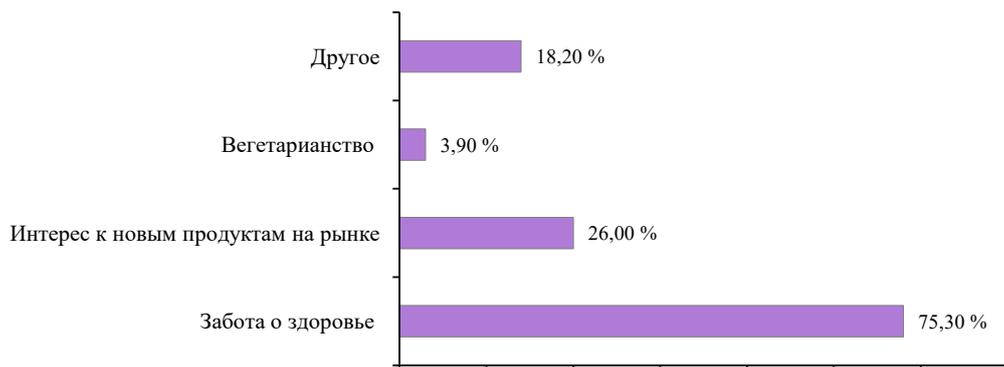


Рисунок 4. Основные причины покупки того или иного вида спирулиносодержащей продукции

Figure 4. Reasons for buying various types of spirulina products



Рисунок 5. Место приобретения продукции со спирулиной

Figure 5. Places to purchase spirulina products

анемией у взрослого населения составляет 14 %. Кроме того, латентный дефицит железа наблюдается еще у около 31 % жителей региона. Существует необходимость введения в постоянный рацион железосодержащих продуктов питания. Таким продуктом является нитчатая цианобактерия *Limnospira fusiformis* штамма О9.13F из озера Соленого.

Вопрос о месте приобретения продукции со спирулиной показал, что в выигрышной позиции находятся интернет-магазины – 48,1 % (рис. 5). Послековидное время приучило население приобретать необходимые вещи и продукты через интернет-магазины. С одной стороны, это достаточно хороший способ продвижения продукции, но в то же время можно задуматься о том, что население просто добавляет продукцию в корзину, не задумываясь о целесообразности данного приобретения. Респонденты, посещающие аптеки (33,8 %) и специализированные магазины (35,1 %), в данном случае являются более целенаправленными покупателями, которые четко понимают цель и подход к выбору продукции, например за счет консультации специалиста (фармацевта или врача).

На рисунке 6 представлены основные причины, которыми руководствуется респондент при выборе продукции на основе спирулины: 42,9 % – ценовая политика среди БАД; 35,1 % – советы родных и знакомых; по 32,5 % – имидж фирмы и консультации продавцов в аптеках; лишь 18,2 % предпочитают доверять информации из СМИ.

Анализ распределения ответов дает достаточно полное представление о предпочтениях населения. Можно сделать вывод, что информация, получаемая из СМИ, не выполняет должным образом свою информационно-аналитическую роль в продвижении жизненно важных компонентов для организма человека или же представлена в несогласованной форме, что приводит к усталости аудитории. Консультационные услуги фармацевтов играют важную роль в продвижении продукта на массовый рынок (32,5 %), что хорошо сочетается с данными предыдущего вопроса. Также это связано с ответом «советы знакомых и родственников» (35,1 %), что может указывать на возможность получения информации от врачей и фармацевтов ранее.

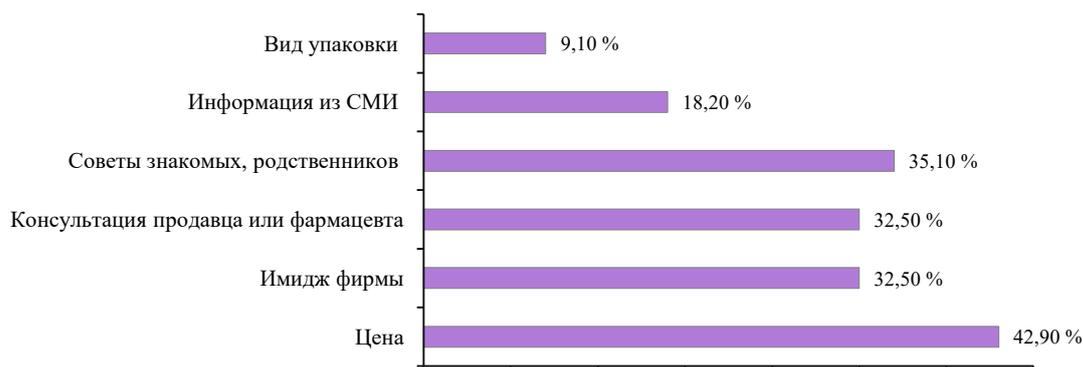


Рисунок 6. Основные причины, которыми руководствуется респондент при выборе продукции на основе спирулины

Figure 6. Buying reasons for spirulina products

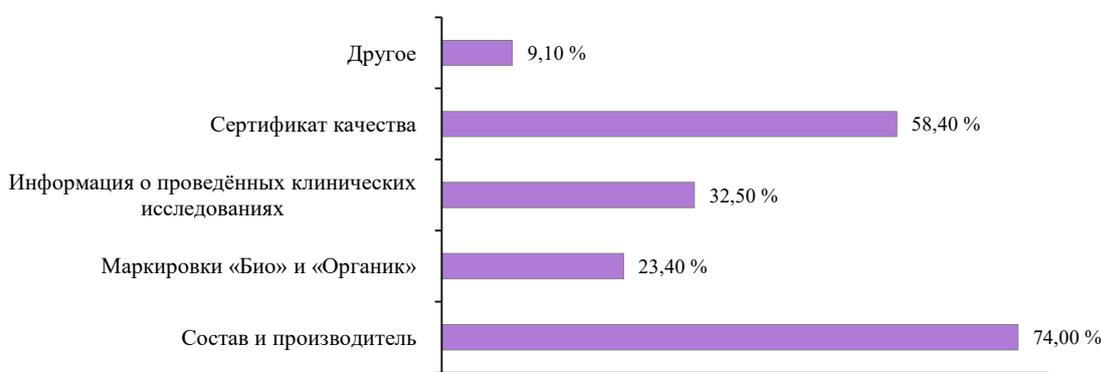


Рисунок 7. Информация, на которую опираются покупатели при выборе спирулиносодержащей продукции

Figure 7. Information that buyers rely on to choose spirulina products

Важно отметить, что ценовая политика продукта является ключевым фактором, на который обращают внимание большинство респондентов (42,9 %). Это может свидетельствовать о том, что население в основном ориентируется на цену и не интересуется конкурентными преимуществами тех или иных товаров. Однако такой вывод не совсем корректен, поскольку противоречит ответам на вопрос о причинах покупки этого вида продукции, где приоритетной причиной стала забота о здоровье.

Тем не менее анализ ответов на вопрос о том, какая информация является важной для покупателя на упаковке (рис. 7), показывает, что состав и производитель считаются наиболее значимыми факторами (74 % респондентов). Покупатель готов также изучать сертификат качества на приобретаемый продукт (58,4 %). В совокупности из полученных ответов можно сделать вывод, что покупатель проводит сравнительный анализ качественных показателей, а затем определяется с выбором продукции. Данный факт очень показателен и может быть использован в дальнейшей работе, т. е. может являться вектором при разработке инфор-

мационной составляющей, вводимой в производственный цикл спирулиносодержащей продукции.

Необходимо отметить, что 32,5 % респондентов готовы изучать результаты клинических испытаний, т. е. подробно исследовать эффект, который можно получить при употреблении данного вида продукции. Это является привлекательным в части продвижения продукции, он может четко обосновать социально значимый эффект от употребления продукции в конкретных случаях, например в работе с железодефицитом (анемия).

В завершении маркетингового исследования необходимо отметить, что на вопрос «Видите ли положительный эффект от применения спирулиносодержащей продукции?» большая часть респондентов ответили положительно (72,7 %). Ответ большинства респондентов на данный вопрос прямо пропорционально фиксируется с ответами на такие вопросы, как «Почему Вам интересны продукты со спирулиной?», «Знаете ли Вы о спирулине и спирулиносодержащих продуктах питания?», «Какие продукты Вы покупаете с содержанием спирулины?», в которых аналогично отмечено большее количество положительных ответов.

В дополнение к вопросу «Чем Вы руководствуетесь при выборе продукции со спирулиной?» важным является ответ на вопрос «Готовы ли Вы рекомендовать спирулиносодержащие продукты своим близким и знакомым?»: «да» ответили более 76,6 % респондентов.

В ходе исследования установлено, что задачи данной работы, касающиеся выявления тенденций в производстве инновационных продуктов питания, имеют значимость и для опрошенной целевой аудитории. Население осознает функциональную ценность пищевой продукции и обоснованно принимает решения при ее выборе.

На начальном этапе исследований было запланировано выявление основных пищевых предпочтений населения. Были изучены потенциальные возможности внедрения регионального объекта исследований в пищевую систему. Согласно проведенному литературному обзору установлено, что любой регион заинтересован в привлечении инвестиций в свою экономику. Но реализация крупномасштабных инвестиционных проектов может иметь существенные социально-экономические последствия для региона. Данные нововведения могут носить как положительный, так и отрицательный характер. Достаточно своевременным является изучение потребительской оценки спирулиносодержащего продукта для социально-экономической эффективности региона.

В итоге проведенного исследования авторами разработан методологический подход, который обеспечивает наиболее полный учет социально-экономических эффектов реализации проекта. В таблице 1 представлены социально-экономические эффекты, на которые планируется сконцентрированно обратить внимание при дальнейших исследованиях данного вопроса.

Выбранный методический подход позволяет провести комплексную оценку региональной социально-экономической эффективности проекта с учетом прямых и косвенных эффектов, а также оценить соответствие проекта целям устойчивого социально-экономического развития региона с помощью количественных показателей. На основе анализа, полученного при оценке социально-экономической эффективности проекта, возможно принятие обоснованного решения об отнесении анализируемого проекта к приоритетным и о его государственной поддержке на региональном уровне. Также предполагается разработка мероприятий по повышению положительных социально-экономических эффектов реализации проекта и снижению отрицательных.

На основании проведенного маркетингового исследования на территории Омской области были выявлены два основных портрета потребителей. Первый портрет потребителя определен по результатам опроса постоянных покупателей, которые составили 19,2 %, а второй – на основе опроса респондентов (80,8 %), не сосредоточенных на покупке и не знающих о спирулиносодержащей продукции (табл. 2).

### Выводы

Разработанная авторами технология культивирования штамма *Limnospira fusiformis* O9.13F для использования в качестве биологически активного вещества позволяет получать значительный объем фитомассы в короткие сроки и с минимальными финансовыми затратами.

Применение данной технологии в промышленных условиях поможет избежать сезонных колебаний при использовании этого вида сырья в пищевой и перерабатывающей промышленности.

Таблица 1. Социально-экономический эффект от внедрения спирулиносодержащих продуктов регионального производства

Table 1. Socio-economic effect of regional spirulina products on the local market

Вид эффекта	Характеристика эффекта
Экономический	Получение регионального продукта с более низкой себестоимостью по сравнению со спирулиносодержащей продукцией, реализуемой региональными представителями (на 40 % ниже для БАД; на 30 % ниже для биоогуртов; на 15 % ниже для хлебобулочных изделий). Увеличение ассортимента региональной функционально-оздоровительной продукции.
Социальный	Снижение риска развития заболеваемости анемией через формирование культуры питания жителей региона. Повышение социальных потребностей населения в продуктах, содержащих легкоусвояемое железо, за счет развития привычного употребления спирулиносодержащей продукции.
Экологический	Устранение из рецептов пищевых продуктов синтетических железосодержащих добавок для перехода на органическое питание, что снизит негативное воздействие на окружающую среду.
Научный	Применение прогрессивных органических технологий, имеющих функциональное значение с обоснованным направлением действия на организм человека.
Ресурсный	Обеспечение рационального использования местной фауны при создании новых функциональных продуктов, значимых для населения Омской области, что делает возможным обеспечение региональной продовольственной независимости.
Бюджетный	Импортозамещение. Спирулиносодержащая продукция местного производства снизит уровень цен на данный видовой ассортимент с последующим вытеснением с регионального рынка иностранных производителей.

Таблица 2. Портрет потребителя спирулиносодержащей продукции в г. Омске

Table 2. Profile of an average Omsk spirulina consumer

Характеристика	Портрет потребителя № 1	Портрет потребителя № 2
Демографическая	Женщины с высшим образованием в возрасте от 41 до 60 лет.	Женщины с высшим и средним образованием в возрасте от 19 до 40 лет.
Социально-экономическая	Доход на 1 члена семьи превышает 30 тыс. руб. в месяц. Сконцентрированы на покупке БАД (таблетки, порошки, капсулы), частота покупок – 1 раз в месяц.	Доход на 1 члена семьи – от 20 до 30 тыс. руб. в месяц. Сконцентрированы на покупке молочной и хлебобулочной продукции с содержанием спирулины, частота покупок – 1 раз в неделю.
Психографическая	Сконцентрированы на заботе о здоровье, предпочитают делать выбор на основе советов знакомых по уровню цены в специализированных аптеках и интернет-магазинах, ориентируясь на состав и производителя. Основной проблемой считают анемию.	Любопытные потребители, заинтересованные в новых продуктах питаниях. При приобретении продукции сконцентрированы на цене и имидже фирмы, предпочитают покупать такую продукцию в специализированных магазинах. Основной проблемой считают слабую информационную оснащенность и видовой ассортимент спирулиносодержащей продукции.

Проведенные исследования позволили сосредоточить внимание на дальнейшем продвижении продукта в производство, а также выявить барьеры при продвижении высококачественного и конкурентоспособного продукта. Определен оптимальный вариант ввода возобновляемого биологического объекта штамма *L. fusiformis* O9.13F в производственный цикл, т. е. коллективом авторов сформирована дальнейшая стратегия развития научно-исследовательского проекта:

1. Целенаправленная работа с той частью населения (19,2 % респондентов), которая является стабильными покупателями спирулиносодержащей продукции, и с той частью респондентов (20,8 %), которые приобретают спирулину раз в неделю (дополнительные информационно-просветительские работы).

2. Первоначальная стадия производственного цикла – технологическое преобразование полученной фитомассы *L. fusiformis* в конечный продукт: порошок сине-зеленого цвета штамма *L. fusiformis* O9.13F с набором определенных показателей качества и безопасности (разработка и утверждение нормативно-технической документации на биологически активное вещество). Это работа на категорию покупателей (79,2 % респондентов), предпочитающих спирулиносодержащую продукцию в виде БАД. Необходимо обращать внимание на качество производимой продукции, т. к. 58,4 % респондентов ставят на первое место состав и сертификационные данные при выборе продукции.

3. Усилить информационно-аналитический поток данных, направленных на подтверждение значимости употребляемых спирулиносодержащих продуктов в разрезе заботы о здоровье, на что нацелены 75,3 % опрошенных (в информационно-просветительской работе показывать результаты клинических испытаний спирулиносодержащей продукции).

4. Отработать этап брендинга спирулиносодержащих БАД на основе *L. fusiformis* для увеличения показателя «Готовность населения приобретать спирулиносодержащие виды БАВ», который составил 28,6 % (разработка бренда, т. е. совокупность свойств, ассоциаций и образов для дальнейшего формирования у покупателя узнаваемого продукта).

5. Поддерживать онлайн-платформы (сайты, интернет-магазины) значимой информацией о выводимом на рынок продукте, т. к. сегодня для покупателя удобный путь приобретения БАД – интернет-магазины (48,1 % опрошенных) (сочетание в информационном потоке брендового образа, клинических испытаний и качественных характеристик продукта).

6. Произвести расчеты себестоимости выводимого на рынок продукта с возможной оптимизацией технологического процесса производства для проведения сравнительного анализа конкурентоспособности продукта, а в дальнейшем и импортозамещающей составляющей, поскольку основополагающим показателем при выборе спирулиносодержащей продукции является ценовая политика (42,9 % респондентов) (спроектировать технико-экономические показатели производственного цикла).

Выявленные портреты потребителей Омской области позволили:

- конкретизировать проблемные места в сфере информационной неосведомленности населения о инновационно-научных разработках ученых своего региона (80,8 % опрошенных);
- удостовериться в правильном выборе населения относительно элементов иммуностимулирующего характера, а именно спирулиносодержащей продукции (19,2 % опрошенных).

Просчитан социально-экономический эффект от внедрения продукта нового поколения (на основе

штамма *L. fusiformis*), который складывается из достаточно конкретных шагов: увеличение ассортимента региональной функционально-оздоровительной продукции; снижение риска развития заболеваемости анемией через влияние на формирование культуры питания жителей г. Омска; устранение из рецептуры синтетических железосодержащих добавок для перехода на органическое питание; применение прогрессивных органических технологий, имеющих функциональное значение с обоснованным направленным действием на организм человека; обеспечение рационального использования местной фауны для устранения дефицита продовольствия, тем самым достижение региональной продовольственной независимости; импортозамещение как возможность введения в оборот продукта со сниженной стоимостью с дальнейшим вытеснением с регионального рынка иностранных производителей.

#### Критерии авторства

Е. А. Молибога – практическое проведение научно-исследовательских работ, связанных с отработкой технологии культивирования *Limnospira fusiformis*; В. В. Леушкина – проведение маркетинговых исследований, анализ полученных данных на основе кабинетных исследований.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Благодарности

Российскому научному фонду за предоставленную возможность проводить полноценный цикл экспериментальных исследований, направленных на изучение возможности культивирования штамма *Limnospira fusiformis* O9.13F.

#### Contribution

E.A. Moliboga was responsible for the experimental research in *Limnospira fusiformis* cultivation; V.V. Leushkina performed the marketing research and analyzed the obtained data.

#### Conflict of interests

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

#### Acknowledgments

The authors express their deepest gratitude to the Russian Science Foundation for the opportunity to conduct a full cycle of experimental studies in cultivating the *Limnospira fusiformis* O9.13F strain.

#### References/Список литературы

1. Wiesen R, Altmann BA, Risius A, Grahl S. Spirulina as Food. [Internet]. [cited 2023 Nov 13]. Available from: <https://www.dlg.org/en/mediacenter/dlg-expert-reports/nutrition/dlg-expert-report-03-2021-spirulina-as-food>
2. Grahl S, Strack M, Weinrich R, Mörlein D. Consumer-Oriented Product Development: The Conceptualization of Novel Food Products Based on Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Resulting Consumer Expectations. Journal of Food Quality. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1919482>
3. SPIRULIX: a spirulina super product made in Austria. [Internet]. [cited 2023 Nov 06]. Available from: [https://www.spirulix.at/en?srsId=AfmBOooZf\\_mnPBDh8AmpP-D9bSoJJ9BdxTdmBbsRLRB6z6Houcl-YVHV](https://www.spirulix.at/en?srsId=AfmBOooZf_mnPBDh8AmpP-D9bSoJJ9BdxTdmBbsRLRB6z6Houcl-YVHV)
4. Vigani M, Parisi C, Rodríguez-Cerezo E, Barbosa MJ, Sijtsma L, Ploeg M, et al. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. Trends in Food Science and Technology. 2015;42(1):81–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>
5. Costa AIA, Jongen WMF. New insights into consumer-led food product development. Trends in Food Science and Technology. 2006;17(8):457–465. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.02.003>
6. Tress A. Ein Vergleich der Ansätze zur Messung der individuellen Preisbereitschaft. Hamburg: Diplomica Verlag GmbH; 2015. 32 p.
7. Spirulina Market Size, Share, Analysis, Industry Trends and Forecast 2022–27. [Internet]. [cited 2023 Nov 13]. Available from: <https://business.times-online.com/times-online/article/icrowdnewswire-2022-12-29-spirulina-market-size-share-analysis-industry-trends-and-forecast-2022-27>
8. Kaledin AP, Stepanova MV. Bioaccumulation of trace elements in vegetables grown in various anthropogenic conditions. Foods and Raw Materials. 2023;11(1):10–16. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-551>; <https://elibrary.ru/QXQNRP>
9. Flyurik EA, Ermakova OS. *Medusomyces gisevii* L.: cultivation, composition, and application. Foods and Raw Materials. 2023;11(1):152–161. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-563>; <https://elibrary.ru/CVKROO>
10. Dmitrieva AI, Faskhutdinova ER, Drozdova MYu, Kutuzov SS, Proskuryakova LA. Phylogenetic Diversity of Microorganisms from the Abakan Arzhan Thermal Spring: Potential Producers of Microbial Energy. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(3):458–468. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2384>; <https://elibrary.ru/RZBSPB>
11. Asyakina LK, Vorobeva EE, Proskuryakova LA, Zharko MYu. Evaluating extremophilic microorganisms in industrial regions. Foods and Raw Materials. 2023;11(1):162–171. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-556>; <https://elibrary.ru/FMXGVG>

12. Bortolini DG, Maciel GM, Fernandes IdeAA, Pedro AC, Rubio FTV, Branco IG, *et al.* Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences*. 2022;5:100134. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100134>
13. Bogdanov VD, Simdiankin AA, Pankina AV, Mostovoi VD. New Functional Formulations for Dry Seafood Concentrates and their Properties. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2020;50(4):707–716. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-4-707-716>; <https://elibrary.ru/UXIRSB>
14. Hassan F, Mahdi W, Al-Haideri H, Kamil DW. Identification of new species record of Cyanophyceae in Diyala River, Iraq based on 16S rRNA sequence data. *Biodiversitas*. 2022;23(10):5239–5241. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d231033>
15. Morais de MG, Alvarengaa AGP, Silva da Vaz B, Costa JAV. Nanoencapsulation of *Spirulina* biomass by electro-spraying for development of functional foods – a review. *Biotechnology Research and Innovation*. 2021;5(2):e2021009. <https://doi.org/10.4322/biori.21050204>
16. Abd El-Baky N, Rezk NMF, Amara AA. *Arthrospira platensis* Variants: A Comparative Study Based on C-phycocyanin Gene and Protein, Habitat, and Growth Conditions. *Journal of Marine Science and Engineering*. 2023;11(3):663. <https://doi.org/10.3390/jmse11030663>
17. Pogorelova NA, Boyko TV, Moliboga EA. Intensity of blood lipidperoxidation when added spirulin-containing processed analogue cheese in the diet (experimental study). *Agricultural Bulletin of Stavropol Region*. 2018;(3):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.31279/2222-9345-2018-7-31-15-20>; <https://elibrary.ru/YLQXJJ>
18. Ainas M, Hasnaoui S, Bouarab R, Abdi N, Drouiche N, Mameri N. Hydrogen production with the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2017;42(8):4902–4909. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.056>
19. Andrade G, Labarca TF, Llanca V, Morales P, Sabando K, Ortuno D. Using *Spirulina* as an adjuvant to the treatment of Periodontitis: a systematic review of clinical trials. *Research Square*. 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2539298/v1>
20. Bazhenova OP, Konovalova OA. Phytoplankton of lake Solenoye (Omsk) as a promising source of bioresources. *Contemporary problems of ecology*. 2012;5(3):275–280. <https://doi.org/10.1134/S199542551203002X>; <https://elibrary.ru/RGADAN>
21. Krishnan A, Qian X, Ananyev G, Lun DS, Dismukes GC. Rewiring of Cyanobacterial Metabolism for Hydrogen Production: Synthetic Biology Approaches and Challenges. In: Zhang W, Song X, editors. *Synthetic Biology of Cyanobacteria*. Singapore: Springer; 2018. pp. 171–213. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0854-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0854-3_8)
22. Suzuki S, Yamaguchi H, Kawachi M. The Draft Genome of a Hydrogen-Producing Cyanobacterium, *Arthrospira platensis* NIES-46. *Journal of Genomics*. 2019;7:56–59. <https://doi.org/10.7150/jgen.38149>
23. Makeeva EG, Osipova NV. Algae of the Salt Lake Altaiskoye (republic of Khakassia): taxonomic composition and ecological features. *Inland Water Biology*. 2022;15(2):107–114. <https://doi.org/10.1134/S1995082922020067>
24. Nowicka-Krawczyk P, Mühlsteinová R, Hauer T. Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). *Scientific Reports*. 2019;9:694. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36831-0>
25. Dadheech PK, Ballot A, Casper P, Kotut K, Novelo E, Lemma B, *et al.* Phylogenetic relationship and divergence among planktonic strains of *Arthrospira* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) of African, Asian and American origin deduced by 16S–23S ITS and phycocyanin operon sequences. *Phycologia*. 2010;49(4):361–372. <https://doi.org/10.2216/09-71.1>
26. Furmaniak MA, Misztak AE, Franczuk MD, Wilmotte A, Waleron M, Waleron KF. Edible Cyanobacterial Genus *Arthrospira*: Actual State of the Art in Cultivation Methods, Genetics, and Application in Medicine. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2541. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02541>
27. Kareem HA, Alghanmi HA. Effects of various light intensities on phycocyanin composition of cyanobacterium *Limnospira fusiformis* (Voronichin) Nowicka-Krawczyk, Mühlsteinová et Hauer. *Malaysian Journal of Science*. 2023;42(1):1–6. <https://doi.org/10.22452/mjs.vol42no1.1>
28. Misztak AE, Waleron M, Furmaniak M, Waleron MM, Bazhenova O, Daroch M, *et al.* Comparative Genomics and Physiological Investigation of a New *Arthrospira/Limnospira* Strain O9.13F Isolated from an Alkaline, Winter Freezing, Siberian Lake. *Cells*. 2021;10(12):3411. <https://doi.org/10.3390/cells10123411>
29. Moliboga EA, Bazhenova OP. Cultivating *Limnospira fusiformis* from Lake Solenoye, Omsk. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(4):689–697. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2469>; <https://elibrary.ru/WXUYQA>

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2549>  
<https://elibrary.ru/ESAOJO>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Коллаген, гидролизованный из сырья маралов: технология получения и биохимический состав



М. Г. Кротова\*<sup>ORCID</sup>, И. Н. Гришаева<sup>ORCID</sup>

Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Россия

Поступила в редакцию: 13.03.2024  
Принята после рецензирования: 14.05.2024  
Принята к публикации: 04.06.2024

\*М. Г. Кротова: [otdel\\_wniipo@mail.ru](mailto:otdel_wniipo@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-7878-8529>  
И. Н. Гришаева: <https://orcid.org/0000-0002-5172-4143>

© М. Г. Кротова, И. Н. Гришаева, 2024



### Аннотация.

Коллаген получает все большее признание как составная часть лечебного питания благодаря многостороннему и благоприятному действию на организм человека. Среди огромного разнообразия источников коллагена особое место занимает сырье пантовых оленей, которое более 20 веков используется в традиционной китайской медицине для поддержания здоровья, в том числе костно-мышечной системы. Цель исследования – провести анализ биохимического состава сырья маралов и гидролизованного коллагена в зависимости от технологии получения.

Объектами исследования являлись шкуры и сухожилия 10 маралов. Сырье измельчали до фарша и гидролизовали. Мас-совую долю коллагена определяли по концентрации оксипролина. Расчет выхода сухих веществ осуществляли по ГОСТ 31640-2012. Определение массовой концентрации макро- и микроэлементов проводили методом атомно-адсорбционной спектроскопии. Аминный азот определяли формольным титрованием. Аминокислотный состав исследовали с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В результате исследований определили аминокислотный состав коллагена. Среди преобладающих аминокислот отмечены глицин – 14,36 г/100 г, пролин – 8,87 г/100 г и оксипролин – 7,83 г/100 г. Выявили различия в концентрации аминокислот в зависимости от технологии получения. При ферментации отметили увеличение содержания аргинина и лизина в 4–5 раз, а при высокотемпературной экстракции – оксипролина, глутаминовой кислоты и треонина в 1,5–2,3 раза. Показали, что для получения коллагена с максимальным выходом сухих веществ и количеством аминокислот необходимо проводить поэтапный гидролиз, включающий ферментацию и высокотемпературную экстракцию.

Коллаген, гидролизованный из сырья маралов, содержал значительное количество глицина, пролина и оксипролина, что делает перспективным его дальнейшее применение для дополнения продуктов, лимитированных по данным аминокислотам. Необходимо проведение дальнейших исследований влияния гидролизованного коллагена на организм человека.

**Ключевые слова.** Марал, коллаген, шкура, сухожилия, гидролиз, аминокислотный состав, ферментация, зольные компоненты

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках проекта с использованием мер государственной поддержки за счет средств гранта Управления Алтайского края по развитию туризма и курортной деятельности по теме «Проведение научных исследований по изучению природных лечебных ресурсов региона и разработке методик их применения и сохранения, выявлению перспективных территорий для развития санаторно-курортной отрасли в Алтайском крае» (договор 9-2022 от 30.11.2022) и при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) в Федеральном Алтайском научном центре агробиотехнологий.

**Для цитирования:** Кротова М. Г., Гришаева И. Н. Коллаген, гидролизованный из сырья маралов: технология получения и биохимический состав // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 884–896. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2549>

## Collagen Hydrolysed from Maral Raw Material: Production Technology and Biochemical Composition



Maria G. Krotova\*<sup>ORCID</sup>, Irina N. Grishaeva<sup>ORCID</sup>

Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnology, Barnaul, Russia

Received: 13.03.2024  
Revised: 14.05.2024  
Accepted: 04.06.2024

\*Maria G. Krotova: [otdel\\_wniipo@mail.ru](mailto:otdel_wniipo@mail.ru),  
<https://orcid.org/0000-0001-7878-8529>  
Irina N. Grishaeva: <https://orcid.org/0000-0002-5172-4143>

© M.G. Krotova, I.N. Grishaeva, 2024



### Abstract.

Collagen has a complex beneficial effect on human health, which makes it a popular component in various therapeutic diets. Deer antlers are a promising source of collagen. It has been used in traditional Chinese medicine for more than 20 centuries as an additive that supports the musculoskeletal system. The article describes the effect of extraction technology on the amino acid and biochemical composition of collagen obtained from the Altai wapiti, or maral (*Cervus Canadensis*). The research featured hydrolysates obtained from ground skin and tendons of ten marals. The mass fraction of collagen was determined by the concentration of oxyproline. The yield of dry solids was calculated in line with State Standard GOST 31640-2012. The method of atomic adsorption spectroscopy made it possible to calculate the mass concentration of macro- and microelements. Amine nitrogen was detected by formol titration while the general amino acid composition was studied using the method of high-performance liquid chromatography. The list of amino acids included glycine (14.36 g/100g), proline (8.87 g/100g), and oxyproline (7.83 g/100 g). Their concentration depended on the production technology. The content of arginine and lysine increased 4–5 times during fermentation and 1.5–2.3 times during high-temperature extraction of oxyproline, glutamic acid, and threonine. A step-by-step hydrolysis protocol with fermentation and high-temperature extraction provided the maximal yield of dry solids and amino acids. In this study, the collagen hydrolyzed from maral skin and tendons was rich in glycine, proline, and oxyproline, which makes it a prospective additive to be used in products that lack these amino acids. The effect of hydrolyzed maral collagen on the human body needs further research.

**Keywords.** Maral, collagen, skin, tendons, hydrolysis, amino acid composition, fermentation, ash components

**Financing.** The research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement 9-2022, November 30, 2022): Natural therapeutic resources of the Altai Region: application and preservation; Development prospects of health resort industry in the Altai Region.

**For citation:** Krotova MG, Grishaeva IN. Collagen Hydrolysed from Maral Raw Material: Production Technology and Biochemical Composition. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):884–896. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2549>

### Введение

Современный образ жизни, характеризующийся постоянной нехваткой времени, приводит к потреблению высоко переработанной пищи, которая не оказывает благотворного влияния на здоровье человека. Несбалансированные и неполные диеты могут быть причиной многих заболеваний. Исправить данную ситуацию можно посредством специализированной пищевой продукции. Одна из задач лечебного питания – восстановление нарушенного белкового равновесия в организме путем приспособления химического состава рационов к метаболическим особенностям организма. Согласно многочисленным литературным

данным, среди группы белковых продуктов особое место занимает коллаген. Коллаген – это волокнистый белок, который составляет 30 % от общего белка во всех многоклеточных организмах и служит основным компонентом кожи, сухожилий, хрящей, костей, кровеносных сосудов и зубов [1]. Белки, семейства коллагенов, представляют собой группу разнообразных молекул внеклеточного матрикса, связанных появлением коллагенового тройно-спирального домена, как общего структурного элемента [2]. В организмах позвоночных животных зарегистрировано 27 типов коллагена с 42 отчетливыми полипептидными цепями [3]. Результаты многих исследований

демонстрируют, что продукты с коллагеном оказывают благоприятное действие на организм человека [4]. Согласно клиническим исследованиям, употребление коллагена способствует уменьшению болевых ощущений в суставах. Получены положительные результаты при лечении дефектов костной ткани, саркопении, гастроэзофагеального рефлюкса, остеоартрита, ревматоидного артрита и заболеваний зубов. Установлено, что применение порошков коллагена помогает регенерации кожи и заживлению ран, ускорению эпителизации. Показана эффективность применения коллагена для лечения язв при синдроме диабетической стопы [5–8].

В связи с особенностью структуры коллаген является плохо усвояемым белком. Для повышения усвоения его необходимо подвергать гидролизу [9]. По литературным данным, гидролиз изменяет физико-химические свойства белков. Чем выше степень гидролиза, тем сильнее изменяются свойства гидролизующего белкового субстрата. Сообщалось, что гидролизаты белков обладают полезными биологическими функциями и используются в качестве нутрицевтиков для борьбы с различными заболеваниями, включая рак, сердечно-сосудистые заболевания, воспалительные состояния [10].

Гидролизат коллагена богат гидрофильными и гидрофобными аминокислотами, которые придают ему уникальную амфифильную структуру и наделяют разнообразной биологической активностью, и используется в медицинских целях как высокоэнергетическая добавка, гериатрический продукт, а также в составе кишечных, терапевтических или контрольных диет [11]. Применяются белковые гидролизаты в лечении больных со специфическими нарушениями пищеварения, всасывания и аминокислотного обмена [12]. Z. Guo с соавторами в эксперименте показали влияние гидролизата коллагена из костей яка на микробиоту кишечника и выработку короткоцепочечных жирных кислот на модели мышей [13].

Показано влияние гидролизатов в качестве ингибиторов липазы поджелудочной железы, что, в свою очередь, вызывает снижение всасывания жира, способствуя потере веса [14].

Установлено, что перорально потребляемый гидролизат коллагена всасывается кишечником и накапливается в хрящах, что опосредовано значительным увеличением синтеза макромолекул внеклеточного матрикса хондроцитами. Отмечается, что гидролизат коллагена костной ткани крупного рогатого скота содержит кальций-связывающий пептид, способствующий усвоению кальция [15].

Обнаружено, что коллагеновые и желатиновые гидролизаты содержат пептиды, ингибирующие ангиотензинпревращающий фермент, который играет важную роль в регуляции артериального давления, а ингибирование этого фермента может вызывать гипотензивный эффект [16].

На сегодняшний день в качестве источника коллагенового белка используют такое сырье, как бычья шкура, кости, свиная кожа, рыбы кости и кожа [17, 18]. Хорошей альтернативой имеющимся видам коллагенового сырья являются соединительнотканые белки пантовых оленей, которые уже более 20 веков широко используются в традиционных китайских средствах для поддержания здоровья костей, при этом сухожилия оленя считаются более эффективными, чем сухожилия крупного рогатого скота [19].

Существуют исследования, согласно которым экстракт сухожилий оленя может предотвратить потерю костной массы и снизить риск травм опорно-двигательного аппарата. H. Zhang и др., используя в качестве модели овариэктомированных крыс, продемонстрировали влияние экстракта на минеральную плотность костной ткани и уровень гидроксипролина в сыворотке крови, а также гистоморфометрические параметры и механические свойства кости при остеопорозе [20]. Подобные результаты получены на модели остеопороза у крыс, индуцированного ретиноевой кислотой. Исследования показали, что экстракт сухожилий оленя может увеличить минеральную плотность костной ткани и массу кости [21]. В эксперименте I.-L. Wang и др. продемонстрировали, что экстракт сухожилий оленя может улучшить результаты физических упражнений и снизить риск получения травм у спортсменов и заболеваний опорно-двигательного аппарата [22]. Согласно исследованиям X. Xu с соавторами, экстракт сухожилий оленя, полученный с применением ультразвука, обладает антиоксидантным действием и способствует пролиферации клеток костной ткани [23].

Помимо сухожилий, источником коллагена может служить шкура оленей, которая составляет до 7 % от массы туши. Ежегодно на маралофермах в России убою подвергаются порядка 10 % поголовья. Шкуры животных, получаемые в качестве побочного продукта, до сих пор не нашли хозяйственного применения и в основном утилизируются. На сегодняшний день нет данных о получении коллагена из шкур оленей.

Разработка технологии получения и исследования биохимического состава коллагена, гидролизованного из сырья пантовых оленей, является актуальной и позволит получить уникальный продукт с перспективой его дальнейшего внедрения в состав санаторно-курортных диет, в особенности для пациентов с болезнями опорно-двигательного аппарата. Цель исследования – провести анализ биохимического состава сырья маралов и гидролизованного коллагена в зависимости от технологии получения.

#### **Объекты и методы исследования**

Научно-исследовательская работа проводилась в лаборатории переработки и сертификации пантовой продукции «Всероссийского научно-исследова-

тельского института пантового оленеводства» Федерального Алтайского научного центра агробιοтехнологий в 2023 г.

Объектом исследования являлось сырье маралов – шкуры и сухожилия. Образцы сырья были получены от 10 клинически здоровых животных. Взятие материала осуществляли во время убоя в зимний период на опытной станции «Новоталицкое» Чарышского района Алтайского края. Полученное сырье предварительно промывали проточной водой и проводили обезволаживание шкуры. Сухожилия и шкуру нарезают до размера 1×1 см и измельчали до фаршеобразного состояния на мясорубке МИМ-300 (ОАО «Торгмаш», Беларусь). Подготовленное сырье подвергали гидролизу.

На первом этапе исследования провели изучение аминокислотного состава шкуры и сухожилий марала с целью оценки их сырьевого потенциала при получении гидролизованного коллагена.

На втором этапе исследования оценивали влияние гидромодуля на выход сухих веществ при гидролизе сырья. Для выполнения поставленной задачи брали навеску шкуры и сухожилий массой 30 г, заливали дистиллированной водой в соотношении сырья и воды от 1:1 до 1:6 и гидролизовали в автоклаве в течение 6 ч. В каждой из полученных проб определяли массовую долю сухих веществ.

На третьем этапе исследований определяли физико-химические параметры и аминокислотный состав коллагеновых гидролизатов в зависимости от технологии получения. Для выполнения данного этапа коллагенсодержащее сырье подвергали гидролизу с применением различных технологий.

Первый вариант включал ферментативную обработку. В ранее проведенных исследованиях установили положительное влияние ультразвуковых колебаний на процессы экстракции сырья маралов, на основании чего ферментативный гидролиз коллагена проводили с применением ультразвукового оборудования. Сырье ферментировали в ультразвуковой ванне Elmasonic S80H (Elma, Германия) при температуре 45–50 °С, интенсивности ультразвуковых колебаний 22 кГц, в течение 6 ч при гидромодуле 1:5 с

применением ферментов микробного происхождения, в частности, щелочной бактериальной протеазы на основе *Bacillus licheniformis* (Протозим), щелочной грибной протеазы на основе *Acremonium chrysogenum* (Протозим С) и бактериальной протеазы на основе *Bacillus subtilis* (Протеаза нейтральная). Ферментные препараты приобретены в биотехнологической компании «Биопрепарат». В соответствии с технологической инструкцией представленные ферменты обладают коллагеназной и кератиназной активностью. В таблице 1 отражены основные физико-химические параметры ферментных препаратов.

Ферменты вводили в смесь последовательно, сначала бактериальную и грибную протеазы при pH раствора 7,5–8,0 и гидролизовали в течение 3 ч при периодическом перемешивании, добавляли нейтральную протеазу при pH раствора 7,0–7,5 и ферментировали еще 3 ч. Внесение ферментов проводили по ранее отработанной технологии [24, 25]. По окончании гидролиза ферменты нейтрализовали путем нагревания до 75 °С в течение 30 мин. Второй вариант гидролиза включал высокотемпературную обработку в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 1,2 атм в течение 6 ч, гидромодуль 1:5. Во всех представленных образцах, полученных с помощью ферментации и высокотемпературного гидролиза, определяли выход сухих веществ, аминный азот и аминокислотный состав.

На четвертом этапе исследования провели последовательный гидролиз сырья путем ферментирования с последующим автоклавированием. Полученный гидролизат высушивали с применением вакуумной сушки при температуре 45 °С до влажности 8–10 %. В полученных образцах конечного продукта определили биохимический состав (жир, белок, зола, сухое вещество), а также количественное содержание макро- и микроэлементов и аминокислот.

Определение массовой доли коллагена в продукте проводили расчетным способом по концентрации оксипролина в соответствии с ГОСТ 33692-2015.

Расчет выхода сухих веществ осуществляли путем высушивания навески образца до постоянной массы при температуре 105 °С в соответствии с ГОСТ 31640-2012.

Таблица 1. Физико-химические параметры ферментных препаратов

Table 1. Physicochemical parameters of enzyme preparations

Ферментный препарат	Форма выпуска	Активность, ед/г	Температура, °С		pH	
			Рабочий диапазон	Оптимальный диапазон	Рабочий диапазон	Оптимальный диапазон
Протозим (протеаза бактериальная щелочная)	порошок	50000	25–70	55–65	5,5–11,0	6,0–10,0
Протозим С (протеаза грибная щелочная)	порошок	50000	30–70	50–60	5,5–11,5	8,0–10,5
Протеаза нейтральная (бактериальная протеаза)	порошок	50	25–70	55–65	5,5–8,5	6,8–8,0

Показатели влажности и золы определяли в соответствии с ГОСТ 24027.2-80, массовой доли белка по методу Кьельдаля по ГОСТ 25011-2017, массовой доли жира кислотным методом в соответствии с ГОСТ 5867-90. Определение массовой концентрации макро- и микроэлементов проводили методом атомно-адсорбционной спектроскопии на спектрофотометре Shimadzu AA-7000 (Shimadzu, Япония) по ГОСТ Р ИСО 27085-2012.

Аминный азот определяли формальным титрованием по упрощенному методу Зеренсена-Гаврилова. Метод формального титрования основан на реакции щелочных аминогрупп белка с формалином, в результате которой освобождаются карбоксильные кислые группы белка. Для определения аминного азота в стеклянный стакан вносили испытуемый раствор в количестве 2 мл, прибавляли 18 мл воды дистиллированной и нейтрализовали жидкость путем добавления в раствор 0,1 М NaOH или 0,1 М HCl до pH 7,0. Затем вносили 2 мл раствора формальной смеси, нейтрализованной в день исследования. Полученную смесь титровали раствором 0,1 М NaOH до pH 9,2.

Аминокислотный состав исследовали с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии на аппарате Shimadzu LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным-детектированием на длине волны 254 нм. Хроматографическая колонка 250×4,6 мм C18, 5 мкм (MZ-Analysentechnik GmbH, Германия). Хроматографический анализ провели в градиентном режиме при расходе элюента

1,0 мл/мин и температуре термостата колонки 40 °С. В качестве подвижной фазы использовали смесь 6 М раствора ацетата натрия с pH 5,5 (компонент А), 1 % раствор изопропилового спирта в ацетонитриле (компонент В) и 6 М раствор ацетата натрия с pH 4,05 (компонент С). Для построения градуированной зависимости использовали стандартные концентрированные образцы аминокислот (Sigma, Германия), разведенные в 1 М растворе соляной кислоты. Перед исследованием проводили пробоподготовку образцов, путем гидролиза в растворе 6 М соляной кислоты при температуре 110 °С в течение 18 ч с последующей модификацией аминокислот фенилизотиоционатом.

Полученные данные обработаны общепринятыми статистическими методами, используя программное обеспечение MS Excel (office 2010). Разница достоверно значимой считалась при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования проведена оценка сырьевого потенциала сухожилий и шкуры марала для получения коллагена. Поскольку коллаген состоит в основном из белка, на долю которого приходится до 98 % состава сырья, целесообразно оценивать сырье по качественному и количественному составу аминокислот. Полученные результаты представлены на рисунках 1 и 2.

Качественный состав аминокислот – важный параметр, характеризующий сбалансированность рациона по белку. Особенно важны в питании незаменимые

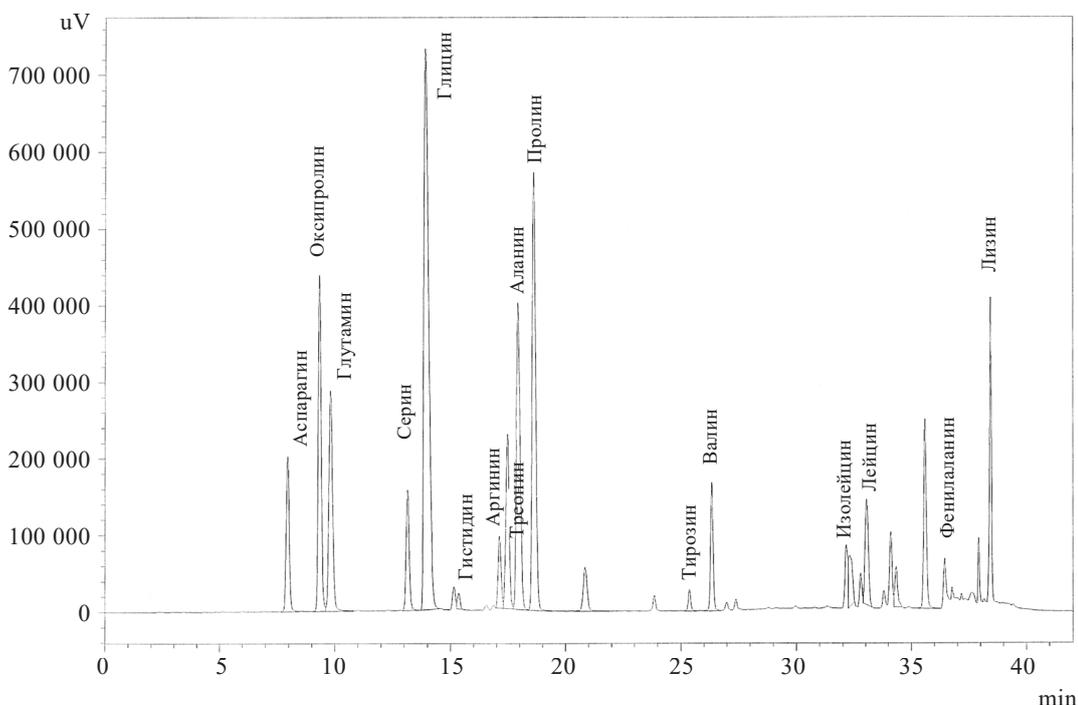


Рисунок 1. Аминокислотный состав сухожилий марала (нативное сырье)

Figure 1. Amino acid composition of maral tendons (native raw material)

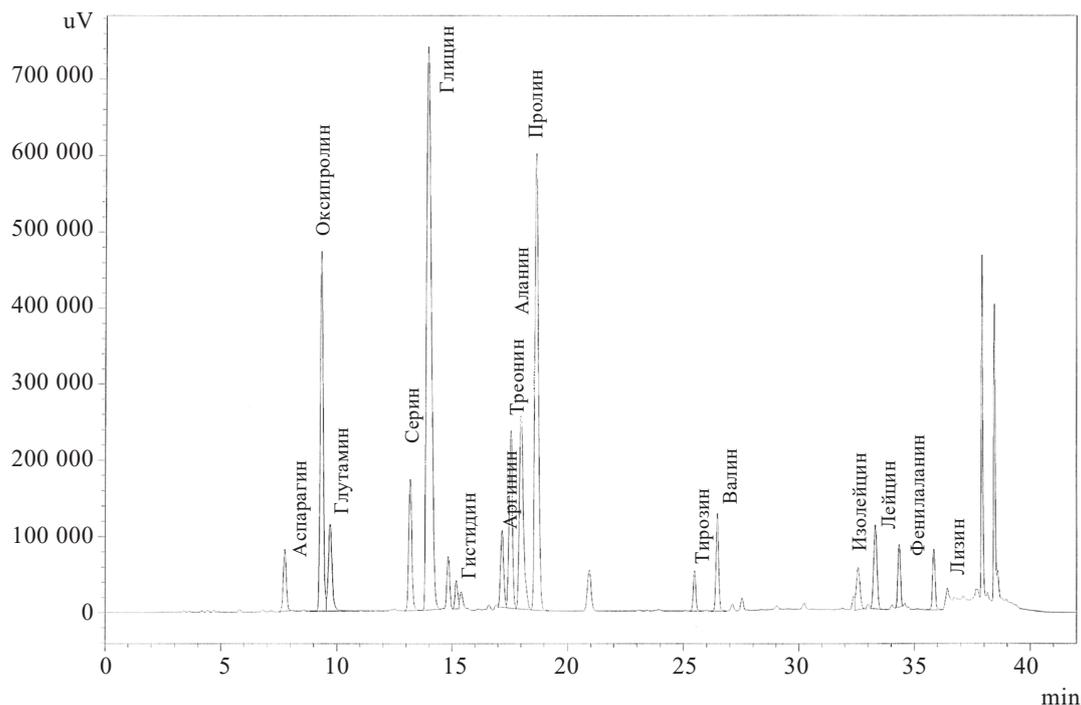


Рисунок 2. Аминокислотный состав шкуры марала (нативное сырье)

Figure 2. Amino acid composition of maral skin (native raw material)

аминокислоты. Исключение из рациона хотя бы одной при сохранении остальных может повлечь за собой задержку роста, а также нарушение белкового обмена. В литературе представлены данные по влиянию на организм дефицита аминокислот. S. Goto с соавторами в эксперименте на крысах показали, что диета с дефицитом валина вызывала тяжелую анорексию, которая связана со значительным снижением концентрации валина в спинномозговой жидкости [26]. В исследованиях на различных видах рыб и креветках показано, что дисбаланс уровня треонина приводит к замедлению роста [27]. В свою очередь недостаток лизина и гистидина вызывает снижение гемоглобина.

По результатам исследования было установлено, что шкура и сухожилия марала имели сходный качественный состав аминокислот. В коллагенсодержащем сырье маралов определено 17 аминокислот. Из числа заменимых аминокислот в составе обнаружены: аспарагиновая кислота (1,33 г/100 г в сухожилиях и 1,22 г/100 г в шкуре), аланин (2,49 г/100 г в сухожилиях и 2,24 г/100 г в шкуре), глутаминовая кислота (2,45 г/100 г в сухожилиях и 1,96 г/100 г в шкуре), оксипролин (4,29 г/100 г в сухожилиях и 2,82 г/100 г в шкуре), пролин (5,80 г/100 г в сухожилиях и 3,98 г/100 г в шкуре), глицин (7,87 г/100 г в сухожилиях и 6,16 г/100 г в шкуре), серин (1,24 г/100 г в сухожилиях и 1,20 г/100 г в шкуре), тирозин (0,53 г/100 г в сухожилиях и 0,43 г/100 г в шкуре), аргинин (2,44 г/100 г в сухожилиях и 0,78 г/100 г в шкуре), гистидин (0,40 г/100 г в сухожилиях и 0,29 г/100 г в шкуре).

Среди преобладающих аминокислот отмечены глицин, пролин, оксипролин, что характерно для коллагенового сырья. S. Chanmangkang с соавторами пришли к выводу, что глицин составляет примерно 30 % от общего количества аминокислотных остатков коллагена [28]. Согласно другим источникам, в коллагене отмечается высокий уровень глицина, пролина и гидроксипролина, составляющих 57 % от общего количества аминокислот коллагена [29]. Высокий уровень глицина обусловлен структурой коллагена, который состоит из трех полипептидных цепей, расположенных в виде тройной спирали с двумя идентичными цепями ( $\alpha 1$ ) и третьей, которая в некоторой степени отличается по своему химическому составу ( $\alpha 2$ ). Амидные протоны глицина и карбонильный кислород остатков X-сайта в последней цепи образуют основную водородную связь для стабилизации тройной спирали. В дополнение к основным водородным связям существует высокий процент соляных мостиков в естественных последовательностях, что имеет важное значение для стехиометрии цепных ассоциаций при сворачивании коллагена [30]. В тройной спирали глицин является единственной аминокислотой, которая может быть включена в спираль без искажения и является строгим требованием для фибриллообразующих коллагенов. Эта фундаментальная структурная единица обычно имеет длину 300 нм и диаметр 1,5 нм и может упаковываться с другими трехцепочечными молекулами коллагена, образуя иерархические структуры [31]. По данным T. Petcharat с соавторами,

содержание аминокислот в коллагене коррелирует с его термической стабильностью и механическими свойствами. Больше содержание пролина и гидроксипролина повышает термостабильность и укрепляет коллаген [32]. По результатам исследования в коллагенсодержащем сырье маралов концентрация глицина составила 20,7 и 21,6 % для сухожилий и шкуры соответственно, а пролин и оксипролин присутствовали в количестве от 10 до 15 % от общей массы аминокислот.

По содержанию глицина, пролина и оксипролина отмечена значительная разница в зависимости от вида сырья. В сухожилиях глицина больше на 28,4 %, пролина на 52,6 %, оксипролина 52,1 %, чем в шкуре марала. Существенная разница отмечена в концентрации аргинина, уровень которого в сухожилиях был в 3,1 раза выше, чем в шкуре.

Среди незаменимых аминокислот в составе коллагенового сырья выявлены: метионин (0,36 г/100 г в сухожилиях и 0,17 г/100 г в шкуре), фенилаланин (1,04 г/100 г в сухожилиях и 0,70 г/100 г в шкуре), лизин (0,99 г/100 г в сухожилиях и 0,83 г/100 г в шкуре), треонин (2,27 г/100 г в сухожилиях и 2,76 г/100 г в шкуре), валин (1,11 г/100 г в сухожилиях и 0,85 г/100 г в шкуре), лейцин (2,56 г/100 г в сухожилиях и 1,78 г/100 г в шкуре), изолейцин (0,84 г/100 г в сухожилиях и 0,55 г/100 г в шкуре). Образцы из сухожилий марала превосходили образцы из шкуры по количественному содержанию метионина на 52,0 %, фенилаланина на 32,7 %, лизина на 16,2 %, валина на 23,4 %, лейцина на 30,5 %, изолейцина на 34,5 %. Уровень треонина, напротив, был выше в шкуре марала на 17,8 % по сравнению с сухожилиями. Превалирующими среди незаменимых аминокислот являлись лейцин и треонин.

Исходя из анализа аминокислотного состава коллагенового сырья маралов, можно заключить, что как шкура, так и сухожилия лимитированы практически по всем незаменимым аминокислотам. На основании чего применение их в качестве источника белка нерационально. Существуют исследования, согласно которым добавление в состав мясных продуктов до 15 % коллагена приводит к повышению их биологической ценности. Указанный уровень коллагена в составе мясного сырья способствует рациональному использованию заменимых и незаменимых аминокислот и повышает анаболическую эффективность мясного белка [33]. На основании этого можно рекомендовать коллагеновое сырье маралов в качестве компонента для дополнения пищевых продуктов.

Несмотря на несбалансированность коллагена по аминокислотам, многочисленными исследованиями подтверждено положительное влияние перорального приема коллагена при лечении болезней суставов. О. Б. Яременко с соавторами считают, что эффект действия коллагена опосредован пептидами, которые представляют собой последовательность аминокислот с различной молекулярной массой. Биологически ак-

тивными пептидами считаются вещества с длиной цепи от 2 до 20 аминокислотных остатков. По сравнению с другими функциональными пищевыми ингредиентами биоактивные пептиды обладают специфическими характеристиками, такими как простая структура, высокая безопасность и хорошая стабильность. Отмечается, что применение пептидов коллагена способствует увеличению поступления аминокислот в хрящ с дальнейшим их использованием в синтезе коллагена в хондроцитах [34]. Сообщается, что лучшей биологической активностью и функциональными свойствами обладают пептиды, которые содержат пролин и гидроксипролин, поскольку они более устойчивы к действию пептидаз в пищеварительном тракте [35]. Согласно исследованиям L. Guo, определенный аминокислотный состав пептидов и специфические группы аминокислот образуют с кальцием хелатный комплекс, повышая его усвояемость [36]. В исследовании пептидов, полученных из плазмы свиней, остатки аспарагина, глутамина и глицина идентифицированы как основные кальций-связывающие сайты [37]. По мнению Н. S. Lee и др., среди различных пептидных последовательностей, входящих в состав гидролизата коллагена, к основным функциональным компонентам относятся Gly-Pro-Hyp и Pro-Hyp [38]. Для получения из нативной формы коллагена короткоцепочечных пептидов и аминокислот, обладающих биологической активностью, необходимо раздробить фибриллы коллагена путем гидролиза сырья [39, 40]. Большая длина молекул коллагена и высокая молекулярная масса (300 кДа) затрудняют его расщепление, поэтому важен подбор оптимальных условий проведения гидролиза, что позволит получить максимальный выход биологически активных компонентов.

При проведении гидролиза технологическое значение имеет гидромодуль. Данный показатель напрямую влияет на интенсификацию диффузионных процессов, а также на затраты при высушивании продуктов. В рамках научных исследований проведена работа по определению гидромодуля, позволяющего наиболее эффективно извлечь белковые компоненты из коллагенового сырья. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, при гидролизе шкур и сухожилий установлена схожая динамика изменения выхода сухих веществ в гидролизат в зависимости от гидромодуля. Отмечено, что массовая концентрация сухих веществ в гидролизате повышалась по мере увеличения гидромодуля и достигала максимума при разведении 1:5 и 1:6. При соотношении 1:1 выход сухих веществ составил 21,92 и 42,7 % для шкуры и сухожилий соответственно. Увеличение водной фазы в 2 раза способствовало возрастанию выхода на 10 %. В дальнейшем интенсивность гидролиза постепенно снижалась, и при гидромодуле 1:5 и 1:6 выход сухих веществ достоверно не изменялся. На основании вышеизложенного оптимальным является проведение

Таблица 2. Условия и результаты гидролиза коллагенового сырья (n = 5)

Table 2. Hydrolysis of collagen raw materials: conditions and results (n = 5)

Гидромодуль	Выход сухих веществ при гидролизе, г к массе сырья (% от массы сырья)	
	Шкура (M ± m)	Сухожилия (M ± m)
1:1	2,61 ± 0,35 (21,90 ± 1,15)	4,41 ± 0,27 (42,73 ± 1,16)
1:2	3,83 ± 0,15*** (31,91 ± 2,75*)	5,92 ± 0,45* (53,00 ± 2,26**)
1:3	5,00 ± 0,21** (41,33 ± 0,96*)	7,00 ± 0,15 (62,82 ± 1,47*)
1:4	5,70 ± 0,61 (47,82 ± 2,15*)	7,74 ± 0,23* (69,71 ± 1,66*)
1:5	6,74 ± 0,25 (55,40 ± 1,75*)	8,30 ± 0,17 (74,92 ± 1,13*)
1:6	6,72 ± 0,77 (56,20 ± 3,11)	8,41 ± 0,86 (75,21 ± 1,83)

Примечание: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  – разница достоверна в сравнении с предыдущим значением.

Note: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  – the difference is significant relative to the previous value.

гидролиза коллагенового сырья маралов при гидромодуле 1:5, данное соотношение позволяет получить высокую концентрацию белковых компонентов в продукте, а дальнейшее увеличение гидромодуля является экономически нецелесообразным. Установлены достоверные различия по содержанию сухих веществ в гидролизатах в зависимости от вида сырья во всех вариантах гидромодуля.

Важным фактором, влияющим на качество гидролизованного коллагена, является способ его получения. Переработка белковых продуктов с использованием ферментных препаратов в последние годы наиболее перспективна. Ферментация – широко используемый метод расщепления пептидных связей и получения пептидов. Ферментативный гидролиз используется для изменения свойств нативных белков, таких как растворимость, вспенивание, эмульгирование, и может повысить биологическую активность [41]. Гидролиз пищевых белков ферментами разработан в 1990-х гг.

в качестве альтернативы кислотного и щелочного гидролиза и имеет ряд существенных преимуществ, таких как мягкие условия обработки, снижение содержания солей, увеличение степени гидролиза и т. д. Согласно данным U. Mohanty с соавторами, с увеличением степени гидролиза возрастают антиоксидантные свойства гидролизатов, что значительно влияет на качество продукции. Установлено, что белковые гидролизаты, полученные путем ферментативного гидролиза, лучшая альтернатива для повышения пищевой ценности различных промышленных побочных продуктов [42]. По сравнению с гидролизатами, произведенными с применением высоких температур, ферментированный коллаген проявляет повышенную растворимость в воде и может потребляться в больших количествах в качестве функционального продукта [43].

В исследовании представлено сравнение двух технологических способов гидролиза коллагенового сырья маралов: ферментативный и высокотемпературный. Качество гидролизатов оценивали по выходу сухих веществ, степени гидролиза и аминокислотному составу. Полученные данные представлены в таблицах 3 и 4.

Как видно из таблицы 3, при переработке шкуры путем ферментации выход сухих веществ выше по сравнению с высокотемпературной экстракцией в среднем на 13 %, тогда как при гидролизе сухожилий, напротив, максимальное количество экстрагируемых веществ получено под действием высоких температур.

Одним из значимых физико-химических показателей качества белковых гидролизатов является степень гидролиза. В результате гидролиза белка образуются пептиды, отличающиеся по молекулярной массе, которая может варьироваться в широком диапазоне. Белковые препараты с высокой степенью расщепления содержат значительное количество низкомолекулярных фракций пептидов. О глубине гидролиза белковых продуктов можно судить по аминному азоту, наличие и количество которого с высокой степенью точности свидетельствует о накоплении в гидролизате низкомолекулярных фракций белков, в частности, свободных аминокислот и пептидов. Показано, что при ферментации концентрация аминного азота достоверно выше по сравнению с высокотемпературной экстракцией

Таблица 3. Показатели качества гидролизатов в зависимости от технологии (n = 5)

Table 3. Effect of technology on quality indicators of hydrolysates (n = 5)

Вид сырья	Способ гидролиза	Показатели (M ± m)	
		Сухое вещество, %	Аминный азот, мг/100 г
Шкура	Ферментация	69,50 ± 1,06	49,00 ± 1,76
	Высокотемпературный гидролиз	56,20 ± 0,74***	42,00 ± 1,03*
Сухожилия	Ферментация	61,89 ± 0,74	70,00 ± 0,85
	Высокотемпературный гидролиз	75,20 ± 1,25***	42,00 ± 0,67***

Примечание: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  – разница достоверна в сравнении с предыдущим значением.

Note: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  – the difference is significant relative to the previous value.

Таблица 4. Аминокислотный состав коллагеновых гидролизатов в зависимости от технологии (n = 5)

Table 4. Effect of technology on amino acid composition of collagen hydrolysates (n = 5)

Аминокислоты	Количественное содержание аминокислот в гидролизатах (M ± m), г/100г					
	Высокотемпературный гидролиз			Ферментация		
	Сухожилия	Шкура	Объединенный гидролизат	Сухожилия	Шкура	Объединенный гидролизат
Аспарагиновая кислота	0,45 ± 0,09	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,05	0,34 ± 0,07	0,31 ± 0,05	0,33 ± 0,01
Аланин	0,40 ± 1,12	0,36 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,52 ± 0,05	0,47 ± 0,12	0,49 ± 0,05
Глутаминовая кислота	0,94 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,86 ± 0,00	0,53 ± 0,16*	0,42 ± 0,24	0,48 ± 0,09*
Оксипролин	1,19 ± 0,03	0,78 ± 0,11	0,91 ± 0,01	0,75 ± 0,21	0,49 ± 0,11	0,58 ± 0,01***
Пролин	0,69 ± 0,10	0,47 ± 0,04	0,58 ± 0,09	0,82 ± 0,25	0,56 ± 0,23	0,70 ± 0,01
Глицин	1,48 ± 0,67	1,16 ± 0,31	1,30 ± 0,02	1,35 ± 0,18	1,06 ± 0,42	1,20 ± 0,09
Серин	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,20 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Цистин+цистеин	–	–	–	–	–	–
Тирозин	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,03
Аргинин	0,08 ± 0,02	0,002 ± 0,00	0,007 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01***
Гистидин	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00
<b>Сумма заменимых аминокислот</b>	<b>5,48 ± 0,27</b>	<b>4,16 ± 0,11</b>	<b>4,90 ± 0,31</b>	<b>4,64 ± 0,13*</b>	<b>3,58 ± 0,21*</b>	<b>4,09 ± 0,27</b>
Метионин	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	–	–	–
Фенилаланин	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,05	0,10 ± 0,00	0,22 ± 0,10	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,05
Лизин	0,15 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,71 ± 0,25	0,59 ± 0,13*	0,63 ± 0,07***
Треонин	0,39 ± 0,11	0,48 ± 0,10	0,43 ± 0,03	0,16 ± 0,09	0,20 ± 0,05*	0,18 ± 0,09***
Триптофан	–	–	–	–	–	–
Валин	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,17 ± 0,10	0,13 ± 0,050	0,15 ± 0,03
Лейцин	0,28 ± 0,06	0,19 ± 0,05	0,24 ± 0,02	0,53 ± 0,15	0,44 ± 0,16	0,45 ± 0,07
Изолейцин	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,08	0,11 ± 0,00
<b>Сумма незаменимых аминокислот</b>	<b>1,23 ± 0,26</b>	<b>1,07 ± 0,22</b>	<b>1,16 ± 0,15</b>	<b>1,92 ± 0,24</b>	<b>1,60 ± 0,33</b>	<b>1,70 ± 0,21</b>
<b>Общая сумма аминокислот</b>	<b>6,71 ± 0,56</b>	<b>5,23 ± 0,48</b>	<b>6,06 ± 0,34</b>	<b>6,56 ± 0,37</b>	<b>5,18 ± 0,41</b>	<b>5,79 ± 0,24</b>

Примечание: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  – разница достоверна при сравнении гидролизатов, полученных разными технологиями из аналогичного сырья

Note: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  – the difference is significant in comparing hydrolysates from similar raw materials obtained by different technologies

на 17 % при гидролизе шкур и на 67 % при гидролизе сухожилий. Высокий уровень аминного азота в ферментативных гидролизатах из сухожилий может свидетельствовать о высокой субстратной специфичности применяемых ферментов к данному виду сырья.

На следующем этапе исследования определен аминокислотный состав гидролизатов из коллагенового сырья. Полученные данные представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, по сумме заменимых аминокислот образец, полученный путем высокотемпературной экстракции, превосходил ферментативный гидролизат в среднем на 16–20 % в зависимости от вида сырья. Показано достоверное увеличение содержания оксипролина, глутаминовой кислоты и треонина при высокотемпературном гидролизе по сравнению с экстрактом, полученным при ферментативном гидролизе. Количественное содержание аргинина и лизина достоверно выше в ферментативных гидролизатах.

Исходя из результатов анализа качественного и количественного состава аминокислот гидролизатов из

коллагенсодержащего сырья маралов, показано, что объединенные гидролизаты, полученные при гидролизе шкуры и сухожилий, взятых в равном соотношении, практически не отличаются от гидролизатов, полученных при гидролизе отдельно шкуры и сухожилий. Использование шкуры при получении коллагена является экономически более целесообразным ввиду низкой стоимости сырья.

На завершающем этапе для получения концентрированного продукта с высоким содержанием питательных компонентов гидролизаты высушили до влажности 6–10 % и провели оценку биохимического и аминокислотного состава готового продукта. Результаты представлены в таблице 5.

Согласно данным биохимического состава, уровень белка в гидролизованном коллагене составил 88,1 % при влажности готового продукта 6,1 %. Показано высокое содержание коллагена в продукте, массовая доля которого составила 87,7 % от массы белка. В числе других компонентов сухого вещества отмечены

Таблица 5. Биохимический состав гидролизованного коллагена маралов (n = 5)

Table 5. Biochemical composition of hydrolyzed maral collagen (n = 5)

Химический состав (M ± m)	
Массовая доля сухого вещества, %	93,90 ± 1,25
Массовая доля жира, %	1,60 ± 0,07
Массовая доля белка, %	88,11 ± 0,15
Массовая доля золы, %	4,22 ± 0,05
Массовая доля влаги, %	6,10 ± 0,11
Массовая доля коллагена, %	77,30 ± 1,15
Макроэлементы, г/кг	
Фосфор	2,61 ± 0,09
Кальций	5,33 ± 0,10
Магний	0,30 ± 0,02
Калий	6,41 ± 0,11
Натрий	1,60 ± 0,09
Хлор	3,60 ± 0,25
Сера	5,44 ± 0,15
Микроэлементы, мг/кг	
Железо	92,70 ± 1,12
Медь	2,81 ± 0,07
Цинк	4,42 ± 0,02
Марганец	7,30 ± 0,13

Таблица 6. Аминокислотный состав коллагена, гидролизованного из сырья маралов (n = 5)

Table 6. Amino acid composition of collagen hydrolyzed from maral raw materials (n = 5)

Наименование аминокислоты	Количество (M ± m), г/100 г	% от общего количества
Аспарагиновая кислота	2,15 ± 0,10	3,58
Аланин	4,40 ± 0,35	7,33
Глутаминовая кислота	3,24 ± 0,11	5,40
Оксипролин	7,83 ± 0,56	13,04
Пролин	8,87 ± 0,76	14,78
Глицин	14,36 ± 0,96	23,93
Серин	2,65 ± 0,22	4,42
Цистин+цистеин	–	–
Тирозин	0,51 ± 0,07	0,85
Аргинин	1,61 ± 0,34	2,68
Гистидин	0,94 ± 0,21	1,57
<b>Сумма заменимых аминокислот</b>	<b>46,56 ± 0,67</b>	<b>77,57</b>
Метионин	0,22 ± 0,03	0,37
Фенилаланин	1,52 ± 0,21	2,53
Лизин	0,61 ± 0,09	1,02
Треонин	6,75 ± 0,87	11,25
Триптофан	–	–
Валин	1,36 ± 0,13	2,27
Лейцин	1,79 ± 0,24	2,98
Изолейцин	1,21 ± 0,54	2,02
<b>Сумма незаменимых аминокислот</b>	<b>13,45 ± 0,32</b>	<b>22,41</b>
<b>Общая сумма аминокислот</b>	<b>60,02 ± 0,75</b>	<b>100,00</b>

жир, присутствующий в составе продукта в минимальном количестве (1,6 %), и зольные вещества (4,2 %). По данным биохимического состава гидролизованного коллагена определена его энергетическая ценность, равная 366,8 ккал на 100 г продукта.

Зольные компоненты представлены макро- и микроэлементами. Согласно полученным данным, в гидролизованном коллагене в преобладающем количестве присутствовали калий, сера и кальций. В 100 г порошка гидролизованного коллагена содержалось в среднем 640 мг калия, 540 мг серы и 530 мг кальция. В числе других макроэлементов отмечены фосфор в количестве 260 мг/100 г, натрий – 160 мг/100 г, хлор 360 мг/100 г, а также магний в минимальном количестве 30 мг/100 г.

Из числа микроэлементов в преобладающем количестве выявлено железо 9,2 мг/100 г, в следовом количестве отмечены медь, цинк и марганец. Зольные вещества, присутствующие в составе гидролизованного коллагена, находятся в легкоусвояемой форме. В пище макро- и микроэлементы находятся в составе органических соединений, а именно связаны с белками, аминокислотами и фосфолипидами. В структуре органических соединений активность указанных элементов в организме возрастает в сотни тысяч раз по сравнению с их ионным состоянием [44]. Следовательно, данные элементы, находясь в составе продукта в минимальном количестве, могут оказывать влияние на организм человека.

Проведена оценка аминокислотного состава гидролизованного коллагена оленя. Полученные данные представлены в таблице 6.

Как видно из таблицы 6, в гидролизованном коллагене общая сумма аминокислот составила 60,02 г/100 г, из них 46,56 г/100 г заменимых аминокислот и 13,45 г/100 г незаменимых аминокислот. В коллагеновом сырье и в гидролизованном коллагене, преобладающими являлись такие аминокислоты как глицин, пролин и оксипролин. Количественное содержание аминокислот в готовом продукте увеличилось по сравнению с сырьем в 1,3–2,3 раза, исключение составили тирозин, аргинин, метионин, лизин, валин и лейцин, уровень которых достоверно не изменился.

### Выводы

Исходя из анализа аминокислотного состава коллагенового сырья маралов, можно заключить, что шкура и сухожилия лимитированы практически по всем незаменимым аминокислотам, на основании этого использование их в качестве источника белка нерационально. Однако можно рекомендовать применение для обогащения пищевых продуктов, в частности глицином, пролином и оксипролином, которые составляют 15–21 % от массы аминокислот коллагена маралов.

Установлено, что при переработке шкур и сухожилий марала для получения максимального выхода сухих

веществ целесообразно проводить гидролиз при гидро-модуле 1:5. Показаны различия в концентрации аминокислот в зависимости от технологии получения, в частности при ферментации отмечено увеличенное содержание аргинина и лизина, а при высокотемпературной экстракции показано увеличение концентрации глутаминовой кислоты, оксипролина и треонина. Из результатов можно заключить, что для получения коллагенового продукта с максимальным выходом сухих веществ и количеством как заменимых, так и незаменимых аминокислот необходимо проводить поэтапный гидролиз сырья маралов, включающий как ферментативную обработку, так и высокотемпературную экстракцию, что позволит расширить спектр аминокислот и увеличить выход готового продукта.

Данные биохимического анализа коллагена, гидролизованного из сырья маралов, позволили отнести данный вид белкового продукта к первой категории в соответствии с общими техническими требованиями межгосударственного стандарта ГОСТ 33692-2015. Установлено, что коллаген, гидролизованный из сырья маралов, содержит 17 аминокислот в количестве 60,02 г/100 г, из них 46,56 г/100 г заменимых аминокислот и 13,46 г/100 г незаменимых аминокислот. Зольные компоненты в преобладающем количестве

представлены калием 640 мг/100 г, серой 540 мг/100 г и кальцием 530 мг/100 г.

Анализ аминокислотного состава коллагена маралов свидетельствует о перспективности его дальнейшего применения в составе функциональных продуктов питания в качестве белкового компонента, а также в составе рационов санаторно-курортного лечения и спортивного питания.

#### **Критерии авторства**

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи.

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в связи с публикацией данной статьи.

#### **Contribution**

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

#### **Conflict of interest**

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

### **References/Список литературы**

1. Sun S, Gao Y, Chen J, Liu R. Identification and release kinetics of peptides from tilapia skin collagen during alcalase hydrolysis. *Food Chemistry*. 2022;378:132089. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132089>
2. Nuñez SM, Guzmán F, Valencia P, Almonacid S, Cárdenas C. Collagen as a source of bioactive peptides: A bioinformatics approach. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020;48:101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.09.009>
3. Palamutoğlu R, Palamutoğlu MI. Beneficial health effects of collagen hydrolysates. *Studies in natural products*. 2024;80:477–503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15589-5.00014-1>
4. Wang H. A Review of the Effects of Collagen Treatment in Clinical Studies. *Polymers*. 2021;13(22):3868. <https://doi.org/10.3390/polym13223868>
5. Shavlovskaya OA, Bokova IA, Romanov ID, Shavlovsky NI. Efficacy of undenatured and hydrolyzed type II collagen in the treatment of pain syndrome. *Russian Medical Inquiry*. 2022;6(10):571–575. (In Russ.). <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2022-6-10-571-575>
6. Gromova OA, Torshin IYu, Lila AM, Shavlovskaya OA. On the prospects for the use of undenatured type II collagen in the treatment of osteoarthritis and other joint diseases. *Modern Rheumatology Journal*. 2022;16(4):111–116. <http://doi.org/10.14412/1996-7012-2022-4-111-116>
7. Oslan SNH, Li CX, Shapawi R, Mokhtar RAM, Noordin WN, Huda N. Extraction and Characterization of Bioactive Fish By-Product Collagen as Promising for Potential Wound Healing agent in Pharmaceutical Applications: Current Trend and Future Perspective. *International of Food Science*. 2022;9437878. <https://doi.org/10.1155/2022/9437878>
8. Xu R, Wu J, Zheng L, Zhao M. Undenatured type II collagen and its role in improving osteoarthritis. *Ageing Research Reviews*. 2023;91:102080. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102080>
9. Kıyak BD, Çinkır NI, Çelebi Y, Malçok SD, Koç GC, Adal S, Yüksel AN, et al. Advanced technologies for the collagen extraction from food waste – A review on recent progress. *Microchemical Journal*. 2024;201:110404. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110404>
10. Gao R, Yu Q, Shen Y, Chu Q, Chen G, Fenet S, et al. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science and Technology*. 2021;110:687–699. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>
11. Du B, Deng G, Zaman F, Ma H, Li X, Chen J, et al. Huang Antioxidant cuttlefish collagen hydrolysate against ethyl carbamate-induced oxidative damage. *Royal Society of Chemistry*. 2021;11:2337–2345. <https://doi.org/10.1039/d0ra08487e>

12. Shikh EV. Clinical and pharmacological aspects of application of hydrolyzed collagen of the second type for prevention and treatment of osteoarthritis. *Pharmacology and Pharmacotherapy*. 2021;(4):10–18. (In Russ.). [https://doi.org/10.46393/2713-2129\\_2021\\_4\\_10\\_18](https://doi.org/10.46393/2713-2129_2021_4_10_18). <https://elibrary.ru/SNKUBE>
13. Guo Z, Yi D, Hu B, Zhu L, Zhang J, Yang Y, *et al.* Supplementation with yak (*Bos grunniens*) bone collagen hydrolysate altered the structure of gut microbiota and elevated short-chain fatty acid production in mice. *Food Science and Human Wellness*. 2023;12(5):1637–1645. <http://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.02.017>
14. González-Noriega JA, Valenzuela-Melendres M, Hernández-Mendoza A, Astiazarán-García H, Ángel Mazorra-Manzano M, Peña-Ramos EA. Hydrolysates and peptide fractions from pork and chicken skin collagen as pancreatic lipase inhibitors. *Food Chemistry: X*. 2022;13:100247. <http://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100247>
15. Qi L, Zhang H, Guo Y, Zhang C, Xu Y. A novel calcium-binding peptide from bovine bone collagen hydrolysate and chelation mechanism and calcium absorption activity of peptide-calcium chelate. *Food Chemistry*. 2023;410:135387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135387>
16. Li B, Chen F, Wang X, Ji B, Wu Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2007;102(4):1135–1143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.002>
17. Wang H, Tu Z, Wang H. Preparation of high content collagen peptides and study of their biological activities. *Food Research International*. 2023;174:113561. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113561>
18. Espinales C, Romero-Pena M, Calderon G, Vergara K, Caceres PJ, Castillo P. Collagen, protein hydrolysates and chitin from by-products of fish and shellfish: An overview. *Heliyon*. 2023;9(4):e14937. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14937>
19. Zhou Z, Zhao D, Zhang P, Zhang M, Leng X, Yao B. The enzymatic hydrolysates from deer sinew promote MC3T3-E1 cell proliferation and extracellular matrix synthesis by regulating multiple functional genes. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21:59. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03240-2>
20. Zhang H, Dong Y, Qi B, Liu L, Zhou G, Bai X, *et al.* Preventive effects of collagen peptide from deer sinew on bone loss in ovariectomized rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014(1):627285. <https://doi.org/10.1155/2014/627285>
21. Zhang H, Zhao Y, Li YQ, Sun XD, Bai XY, Zhao DQ. Effects of deer tendons collagen on osteoporosis rats induced by retinoic acid. *Zhong Yao Cai*. 2010;33(3):411–414.
22. Wang I-L, Hsiao C-Y, Shen J, Wang Y, Huang C-C, Chen Y-M. The effects of Jilin sika Deer's (*Cervus dybowski*) tendon liquid supplementation on endurance drop jumps performance, biochemistry profile of free boxing players. *Journal Ethnopharmacology*. 2019;245:112119. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112119>
23. Xu X, Wang D, Li J, Zeng X, Zhang Z, Zhu J, *et al.* Collagen hydrolysates from deer tendon: Preparation assisted with different ultrasound pretreatment times and promotion in MC3T3-E1 cell proliferation and antioxidant activities. *Process Biochemistry*. 2023;133:228–240. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.09.010>
24. Krotova MG, Lunitsyn VG. Effectiveness of using enzymes of microbial origin in maral raw stuff processing. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2017;47(5):97–103. (In Russ.). <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2017-5-12>; <https://elibrary.ru/TLOWWE>
25. Krotova MG. Improving the technology of hydrolysis of marals' raw materials. *Bulletin of KSAU*. 2020;(5):147–152. (In Russ.). <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-5-147-152>; <https://elibrary.ru/BABKSV>
26. Goto S, Nagao K, Bannai M, Takahashi M, Nakahara K, Kangawa K, *et al.* Anorexia in rats caused by a valine-deficient diet is not ameliorated by systemic ghrelin treatment. *Neuroscience*. 2010;166(1):333–340. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.013>
27. Worlanyo HG, Jiang S, Yu Y, Liu B, Zhou Q, Sun C, *et al.* Effects of dietary threonine on growth and immune response of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2022;128:288–299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.07.072>
28. Chanmangkang S, Maneerote J, Surayot U, Panya A, You S, Wangtueai S. Physicochemical and biological properties of collagens obtained from tuna tendon by using the ultrasound-assisted extraction. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2024;15:100984. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.100984>
29. Guo H, Zhang Q, Liu X, Zhang H, Wang S, Wen X, *et al.* Dietary hydroxyproline promotes collagen deposition in swim bladder through regulating biosynthesis of amino acid: In-vitro and in-vivo investigations in *Nibeia coibor*. *Aquaculture*. 2023;573:739614. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739614>
30. Sun, T, Qiang S, Lu C, Xu F. Composition-dependent energetic contribution of complex salt bridges to collagen stability. *Biophysical Journal*. 2021;120:3429–3436. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.028>
31. Yu C-H, Khare E, Narayan OP, Parker R, Kaplan DL, Buehler J. ColaGen: An end-to-end deep learning model to predict thermal stability of de novo collagen sequences. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2022;125:104921. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104921>
32. Petcharat T, Benjakul S, Karnjanapratum S, Nalinanon S. Ultrasound-assisted extraction of collagen from clown featherback (*Chitala ornata*) skin: yield and molecular characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(2):648–658. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10677>

33. Tekeev AA. The importance of collagen in the biological value of meat. Hygiene and Sanitation. 1997;2:16–19. (In Russ.). [Текеев А. А. Значение коллагена в биологической ценности мяса // Гигиена питания. 1997. Т. 2. С. 16–19.]
34. Yaremenko OB, Anokhina HA, Burianov OA. Joint. Cartilage. Collagen. Injury. 2020;21(4):6–12. (In Russ.). <https://doi.org/10.22141/1608-1706.4.21.2020.212531>; <https://elibrary.ru/BJFWDU>
35. Hernández-Ruiz KL, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Campas-Baypoli ON, Quintero-Guerrero AA, Grijalva-Delgado MdeL. Collagen peptide fractions from tilapia (*Oreochromis aureus* Steindachner, 1864) scales: Chemical characterization and biological activity. Food Bioscience. 2023;53:102658. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102658>
36. Guo L, Harnedy PA, Li B, Hou H, Zhang Z, Zhao X, et al. Food protein-derived chelating peptides: biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. Trends Food Science and Technology. 2014;37(2):92–105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.007>
37. Lee SH, Song KB. Isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolysates of porcine blood plasma protein. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 2009;52:290–294. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2009.051>
38. Lee HS, Oh KJ, Moon YW, In Y, Lee HJ, Kwon SY. Intra-articular injection of type I Atelocollagen to alleviate knee pain: a double-blind, randomized controlled trial. Cartilage. 2021;13(1):342–350. <https://doi.org/10.1177/1947603519865304>
39. Ren B, Yue K, Zhang Y, Fu Y. Collagen-derived peptides as prebiotics to improve gut health. Current Opinion in Food Science. 2024;55:101123. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101123>
40. Ahmed M, Verma AK, Patel R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 2020;18:100315. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100315>
41. Gharehbeglou P, Sarabandi K, Akbarbaglu Z. Insights into enzymatic hydrolysis: Exploring effects on antioxidant and functional properties of bioactive peptides from Chlorella proteins. Journal of Agriculture and Food Research. 2024;16:101129. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101129>
42. Mohanty U, Majumdar RK, Mohanty B, Mehta NK, Parhi J. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. Food Science Technology. 2021;58(11):4349–4358. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04915-3>
43. Bai L, Tian X, Wang Y, Zhang K, Guo J, Ma C, et al. Antioxidant activity during in vitro gastrointestinal digestion and the mode of action with tannins of cowhide-derived collagen hydrolysates: The effects of molecular weight. Food Bioscience. 2023;53:102773. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102773>
44. Viktorova EP, Bokovikova TN, Lisovaya EV. The relevance of creating chelate complexes of biogenic metals and phospholipids for the enrichment of food products. Technologies of the Food and Processing Industry of the Agro-Industrial Complex-Healthy Food Products. 2019;(2):46–50. (In Russ.). [Викторова Е. П., Боковикова Т. Н., Лисовая Е. В. Актуальность создания хелатных комплексов биогенных металлов и фосфолипидов для обогащения продуктов питания // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. 2019. № 2. С. 46–50.]

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2551>  
<https://elibrary.ru/XJGCTX>

Оригинальная статья  
<https://fptt.ru>

## Изучение способности аккумуляции тяжелых металлов растениями в процессе рекультивации отвала угольного разреза



М. А. Осинцева<sup>1,\*</sup>, Е. А. Дюкова<sup>1</sup>,  
Е. Г. Ульянова<sup>2</sup>, А. М. Осинцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кемеровский государственный университет , Кемерово, Россия

<sup>2</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Краснообск, Россия

Поступила в редакцию: 08.07.2024

Принята после рецензирования: 07.08.2024

Принята к публикации: 03.09.2024

\*М. А. Осинцева: [k1marial@inbox.ru](mailto:k1marial@inbox.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-4045-8054>

Е. А. Дюкова: <https://orcid.org/0009-0001-1372-2091>

Е. Г. Ульянова: <https://orcid.org/0000-0002-9154-5238>

А. М. Осинцев: <https://orcid.org/0000-0002-3298-276>

© М. А. Осинцева, Е. А. Дюкова, Е. Г. Ульянова,  
А. М. Осинцев, 2024



### Аннотация.

Основным способом решения экологических проблем, возникающих в результате консервации угольных разрезов после их выработки, является рекультивация технологически измененных земель. Одна из проблем восстановления экосистемы таких земель – загрязнение почвообразующего покрова тяжелыми металлами. Возможным решением этой проблемы может стать использование фиторемедиационного потенциала растений на этапе биологической рекультивации. Цель данного исследования заключалась в изучении аккумуляционной способности высаженных на отвалах угольного разреза травянистых растений (бобовых и злаковых) по отношению к тяжелым металлам.

Объектами исследований являлись образцы грунта и высаженные на нем растения. Исследования проводились на этапе биологической рекультивации экспериментальных участков научно-технического полигона на отвале угольного разреза, расположенного в Прокопьевском районе Кемеровской области – Кузбасса. При создании полигона в 2023 г. была произведена закладка участков с различными вариантами формирования корнеобитаемого слоя. Физико-химические свойства проб грунта и растительного сырья определялись стандартными методами в аккредитованных лабораториях.

На всех участках были высажены травянистые, кустарниковые и древесные растения. В ходе исследования касаются изучена аккумуляционная способность бобовых и злаковых культур. Содержание тяжелых металлов в растительном сырье в большинстве случаев не превышало максимально допустимых уровней в растительных кормах. Например, содержание свинца в абсолютно сухом веществе растительной массы колебалось в пределах 0,35–2,64 мг/кг для злаковых и 1,54–5,25 мг/кг для бобовых культур. Содержание кадмия для различных образцов составило 0,13–0,25 мг/кг для злаковых и 0,19–0,32 мг/кг для бобовых культур. Некоторые образцы демонстрировали заметное превышение максимально допустимого уровня содержания железа в сухом веществе (примерно 400 мг/кг).

В целом результаты исследования продемонстрировали способность травянистых растений накапливать потенциально опасные вещества и уменьшать их концентрацию в почве.

**Ключевые слова.** Биологическая рекультивация, фиторемедиация, фитоэкстракция, тяжелые металлы, злаковые культуры, бобовые культуры

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации от 11.05.2022 г. № 1144-р, комплексной научно-технической программы полного инновационного цикла «Разработка и внедрение комплекса технологий в областях разведки и добычи твердых полезных ископаемых, обеспечения промышленной безопасности, биоремедиации, создания новых продуктов глубокой переработки из угольного сырья при последовательном снижении экологической нагрузки на окружающую среду и рисков для жизни населения» («Чистый уголь – зеленый Кузбасс»), мероприятие 3.1 «Экополигон мирового уровня технологий рекультивации и ремедиации». При финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-1200 от 28.09.2022 г.).

**Для цитирования:** Изучение способности аккумуляции тяжелых металлов растениями в процессе рекультивации отвала угольного разреза / М. А. Осинцева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 4. С. 897–908. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2551>

## Heavy Metals Accumulation in Plants During Coal Mine Reclamation



Maria A. Osintseva<sup>1,\*</sup>, Evgenia A. Dyukova<sup>1</sup>,  
Ekaterina G. Ulyanova<sup>2</sup>, Alexey M. Osintsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

<sup>2</sup> Siberian Federal Research Center for Agro-BioTechnologies, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Russia

Received: 08.07.2024

Revised: 07.08.2024

Accepted: 03.09.2024

\*Maria A. Osintseva: [k1marial@inbox.ru](mailto:k1marial@inbox.ru),

<https://orcid.org/0000-0002-4045-8054>

Evgenia A. Dyukova: <https://orcid.org/0009-0001-1372-2091>

Ekaterina G. Ulyanova: <https://orcid.org/0000-0002-9154-5238>

Alexey M. Osintsev: <https://orcid.org/0000-0002-3298-2761>

© M.A. Osintseva, E.A. Dyukova, E.G. Ulyanova,  
A.M. Osintsev, 2024



### Abstract.

Reclamation solves environmental problems caused by opencast coal mining. Soil contamination with heavy metals is a major problem in restoring the ecosystem of disturbed lands. Plants with good phytoremediation potential may be an optimal solution at the stage of biological reclamation. The research featured the heavy metals accumulation potential in legumes and cereals planted on coal mine dumps.

The research objects included soil and plant samples from a coal mine dump near the town of Prokopyevsk, Kemerovo Region. The testing ground (2023) consisted of sections with different options for root formation. The physicochemical properties of soil samples and plant materials were determined by standard methods in accredited laboratories.

The sections were planted with herbs, shrubs, and trees; the research reported in this article focused on legumes and cereals. The content of heavy metals in the plant samples stayed below the maximum permissible levels for animal feed. The lead content in plant mass solids fluctuated within 0.35–2.64 mg/kg for cereals and 1.54–5.25 mg/kg for legumes. The cadmium content was 0.13–0.25 mg/kg for cereals and 0.19–0.32 mg/kg for legumes. However, the content of iron in some samples was far above the permissible level and reached 400 mg/kg.

In this study, legumes and cereals were able to accumulate potentially hazardous substances, thus reducing their concentration in post-mining soil.

**Keywords.** Biological reclamation, phytoremediation, phytoextraction, heavy metal content, legumes, cereals

**Funding.** The research was part of a comprehensive scientific innovative program initiated by Russian Federation Government Decree No. 1144-r, May 11, 2022: Developing and implementing new technologies in the E&P of solid minerals, industrial safety, bioremediation, and product development of deep coal processing: a consistent reduction of environmental impact and hazards (Clean Coal – Green Kuzbass), Stage 3.1: An ecological test-site of world-class reclamation and remediation technologies (Agreement No. 075-15-2022-1200, September 28, 2022).

**For citation:** Osintseva MA, Dyukova EA, Ulyanova EG, Osintsev AM. Heavy Metals Accumulation in Plants During Coal Mine Reclamation. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(4):897–908. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-4-2551>

### Введение

После завершения разработки угольных разрезов на их месте остается огромная площадь с технологически измененным рельефом, практически лишенная растительности и, как правило, загрязненная токсичными веществами. Процесс биологической рекультивации техногенно нарушенных земель угледобывающих предприятий требует решения сложной многофак-

торной задачи. Рекультивация земель после открытой добычи угля включает в себя целый комплекс работ. В идеальном случае для оценки и социально-экономических результатов рекультивации должен быть обеспечен обширный набор геологических, физико-химических и экологических измерений. Только такой целостный обзор основных параметров рекультивации способен обеспечить ее положительный результат [1].

Частичное восстановление нарушенного рельефа осуществляется на технологическом этапе рекультивации. Проводятся мелиоративные работы, и формируются условия для биологического этапа, связанного с созданием растительного покрова рекультивируемой территории. Финальный этап биологической рекультивации обеспечивает восстановление техногенно нарушенной экосистемы, возобновление процесса почвообразования и формирование способности почвы к самоочищению [2–7].

Загрязнение окружающей среды опасными веществами в результате промышленной деятельности человека, в частности добычи полезных ископаемых, становится серьезной проблемой во всем мире. Для очистки почвы доступно несколько физических, химических и биологических методов рекультивации. Фиторемедиация рассматривается в качестве одного из экономически эффективных подходов к экологической реабилитации техногенно нарушенных земель. Этот способ биологической очистки почвы использует способность растений концентрировать элементы и соединения в процессе своего роста и детоксицировать различные соединения, не вызывая дополнительного загрязнения. Концентрирующий эффект является результатом способности определенных растений биоаккумулировать химические вещества. Основное преимущество фиторемедиации перед другими методами состоит в том, что загрязнения удаляются из почвы, не разрушая ее структуры, и без снижения почвенного плодородия.

Фиторемедиация использует различные механизмы для разложения, удаления или иммобилизации загрязняющих веществ [8], включая ризодеградацию, фитодegradацию, фитоэкстракцию, ризофилтрацию, фитоволатализацию (или фитоиспарение) и иммобилизацию (фитостабилизацию). Фитодegradация – это метаболизм, приводящий к разложению опасных загрязнений, например нефтепродуктов, внутри побегов растений за счет производимых растениями ферментов. Ризодеградация отличается от фитодegradации тем, что процессы разложения загрязнений происходят в прикорневой системе растений – в ризосфере. Фитоэкстракция приводит к накоплению вредных примесей, например тяжелых металлов, внутри растений, тем самым очищая почву. Ризофилтрация – это процесс фитофиксации, приводящий к очистке прикорневой воды. Фитостабилизация способствует удержанию загрязнений в растительной биомассе.

Н. В. Фотина и др. предложили перечень рекомендованных растений для биологического этапа рекультивации, в том числе культур растений, обладающих высокой поглотительной способностью в отношении поллютантов. Приведены примеры микроорганизмов и их комплексов, применяемых для целей биоремедиации [9]. М. Azizi с соавторами выявили, что накопление потенциально токсичных и редкоземельных элементов в растениях и их транслокация из

корня в побег различаются в зависимости от вида растений и образцов почв [10]. Исследования Т. Shakeel и др. направлены на оценку способности различных видов растений накапливать, концентрировать и переносить тяжелые металлы на территории загрязненного участка угольной добычи [11]. Примерный перечень растений для использования в фиторемедиационных целях в городской среде описан в работе Е. Ю. Зайковой и С. С. Фефановой [12].

Целый ряд полевых испытаний подтвердил возможность использования растений для очистки окружающей среды. Например, О. Akhtar с соавторами выявили возможность использования грибов арбускулярной микоризы для очистки сельскохозяйственных земель от избытка хрома [13]. L. Marchiol и др. оценивали фиторемедиационный потенциал однолетних культур *Sorghum bicolor* и *Helianthus annuus* с высоким урожаем биомассы, выращенных на полиметаллической почве [14]. Результаты эксперимента признаны вполне успешными. В обзорной статье V. Shah и A. Daverey обсуждаются ограничения и будущие направления в области устойчивой фиторемедиации. Отмечено, что фиторемедиация на данный момент менее эффективна, чем физические методы, она находится на стадии активной разработки и, судя по всему, может стать вполне конкурентоспособной, учитывая ее экологические и коммерческие перспективы [15].

Добыча угля, как правило, приводит к распространению тяжелых металлов в окружающей среде. Наиболее опасные для окружающей среды тяжелые металлы и металлоиды включают хром, никель, медь, цинк, кадмий, свинец, ртуть и мышьяк. Использование принципов фиторемедиации требует выявления растений, устойчивых к таким металлам и способных накапливать их в значительном количестве. В работе N. L. Sanami и др. оценивался фиторемедиационный потенциал растений в заброшенных угольных отходах на севере Ирана. Исследования показали умеренное загрязнение Cu, Ni, V, Zn, Pb, Cr и As в угольных отходах. Была продемонстрирована роль местных растений, включая многолетние и однолетние растения с различными жизненными формами, в извлечении и стабилизации металлов для устойчивого управления угольными отходами [16].

Тяжелые металлы являются хорошо известными загрязнителями окружающей среды из-за их токсичности, стойкости в окружающей среде и биоаккумулятивной природы. Их антропогенными источниками являются добыча полезных ископаемых, а также различные промышленные и сельскохозяйственные виды деятельности. Трофический перенос этих элементов в водных и наземных пищевых цепях / сетях имеет важные последствия для дикой природы и здоровья человека [17]. Всестороннее исследование химии окружающей среды и экотоксикологии опасных тяжелых металлов и металлоидов показывает, что необходимо предпринять шаги для минимизации

воздействия этих элементов на здоровье человека и окружающую среду [18, 19].

Целью данной работы являлось исследование фиторемедиационного потенциала многолетних и однолетних бобовых и злаковых растений, высаженных на экспериментальных участках научно-технического полигона, расположенного на одном из отвалов угольного разреза Кемеровской области – Кузбасса.

### Объекты и методы исследования

Исследования фиторемедиационного потенциала проводили поэтапно. Первый этап заключался в исследовании почвенно-климатических условий участков. Устанавливали тип почвы, ее структурные и агрохимические показатели.

На научно-техническом полигоне [5] в результате горнотехнического этапа рекультивации были организованы три участка с различными способами формирования корнеобитаемого слоя, на которых впоследствии был создан различный растительный покров (табл. 1).

На участке № 1 осуществлено послойное нанесение потенциально-плодородных пород мощностью 40–60 см и плодородного слоя почвы мощностью не менее 20–40 см (тип почвы – технозем гумусогенный дифференцированный). Участок № 2 был отсыпан слоем потенциально-плодородных пород (глинозем) мощностью 40–60 см (тип почвы – технозем литогенный недифференцированный). Участок № 3 был сформирован непосредственно на поверхности спланированного отвала, почвообразующий субстрат которого представлен смесью вскрышных и вмещающих пород, слагающих тело отвала (тип почвы – эмбрио-зем инициальный).

Профили почвогрунтов спланированных участков с послойной отсыпкой представлены на рисунке 1, где достаточно хорошо различимы все три описанных выше слоя грунта.

Комплексный анализ образцов почвы, отобранных со всех экспериментальных участков, был проведен после завершения горнотехнических работ в начале лета 2023 г. и повторно – до начала периода вегета-

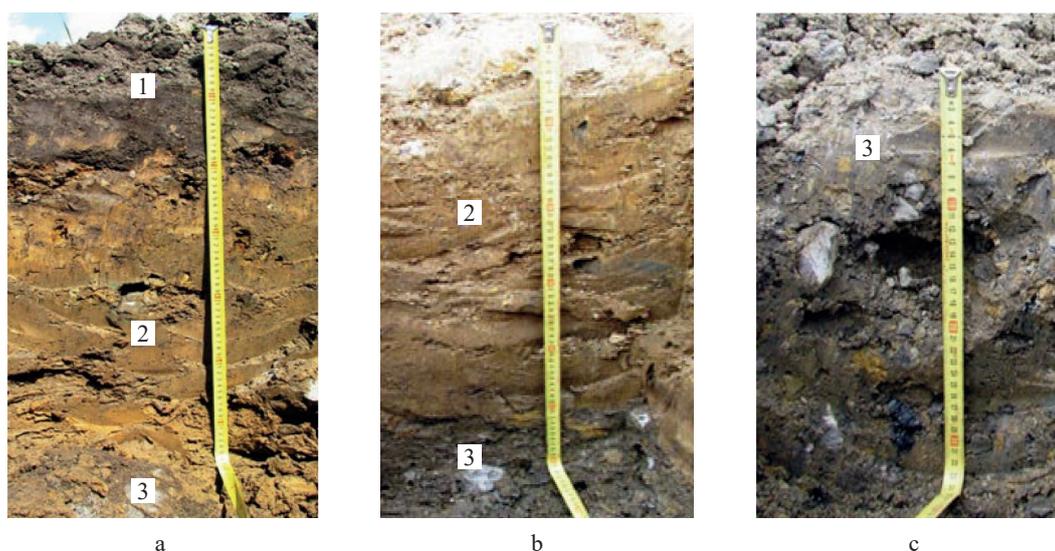


Рисунок 1. Отсыпка участков № 1 (а), № 2 (б) и № 3 (с): 1 – плодородный слой на потенциально-плодородном слое глинозема; 2 – потенциально-плодородный слой глинозема на вскрышной породе; 3 – вскрышные породы

Figure 1. Backfills, areas № 1 (a), № 2 (b), and № 3 (c): 1 – fertile topsoil on potentially fertile alumina; 2 – potentially fertile alumina on overburden; 3 – overburden

Таблица 1. Характеристика выбранных растений фиторемедиаторов

Table 1. Phytoremediators: profile

Название	Характеристика	Функции	Тип почв
Смесь злаковых трав	Неприхотливые однолетние и многолетние травянистые растения	Пополняют запасы калия, азота, структурируют, повышают уровень влагопроницаемости, предотвращают от вымывания	Любые
Смесь бобовых трав	Травянистые однолетние и многолетние растения с плотным стеблем и хорошо развитой корневой системой	Основное преимущество – наличие хорошо развитой мочковатой корневой системы, которая образует большую площадь поверхности для колонизации почвенными микроорганизмами	Любые

ции весной 2024 г. в аккредитованной лаборатории Института почвоведения и агрохимии Сибирского отделения Российской академии наук. Для анализа из выбранного слоя почвы отбирались образцы массой 2,5–5,0 кг.

Определение кислотности солевой и водной вытяжки образцов грунта осуществлялось в соответствии с ГОСТ 26483 и ГОСТ 26423. Анализ органических веществ – по ГОСТ 26213. Исследование подвижного фосфора – по ГОСТ 54650. Определение подвижного калия – по ГОСТ 54650. Уровень нитратного азота – по ГОСТ 26951.

На втором этапе проводили посев выбранных растений на экспериментальных участках и наблюдали за процессом их вегетации [5, 20].

На третьем этапе исследований в конце периода вегетации осенью 2023 и 2024 г. были отобраны пробы растительной массы со всех экспериментальных участков и проанализированы на содержание опасных веществ в аккредитованной лаборатории Центра агрохимической службы «Кемеровский». Для анализа отбирались очищенные от грунта образцы растений массой 0,5–1,0 кг.

Определение биомассы растений осуществлялось в соответствии с ГОСТ Р 56881-2016. Анализ биохимического состава растений проведен в соответствии с ГОСТ 13496.4 (п. 8), ГОСТ 26657 (п. 4) и ГОСТ 30504. Исследование массовой доли сухого вещества растений проводили по ГОСТ 31640 п. 7.

Выявление содержания тяжелых металлов в образцах почвы и растений осуществлялось в соответствии с методическими указаниями по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства [21]. Содержание мышьяка в почвах определялось фотометрическим методом [22].

### Результаты и их обсуждение

Гранулометрический состав определяет практически все физические свойства почв, такие как пористость, плотность сложения, водопроницаемость, влагоемкость, воздушный и гидротермический режимы. В связи с использованием для формирования профиля почвогрунтов техногенных элювиев и суглинка с примесью камней в почвенном профиле исследуемых почвогрунтов участков № 2 и № 3 присутствуют крупные каменные отдельности. В поверхностном слое участка № 1 твердых частиц размером более 3 мм не наблюдается (табл. 2)

На участке № 1 (с послойным нанесением плодородного слоя и потенциально-плодородных пород) содержание каменных отдельностей незначительное. В плодородном слое крупные камни отсутствуют, небольшое их количество отмечается в потенциально-плодородных породах. Максимальное их содержание зафиксировано в техногенном элювии подстилающих пород. По гранулометрическому составу почвогрунты характеризуются как среднесуглинистые.

На участке № 2 (с отсыпкой потенциально-плодородными породами) каменный материал встречается по всему профилю, а наибольшее его количество – в техногенном элювии подстилающих пород. Отсыпанный слой почвогрунта характеризуется как тяжелосуглинистый.

На участке № 3, где почва представлена техногенным элювием, отмечается наибольшее количество каменных отдельностей в корнеобитаемом слое. Как видно из таблицы 2, происходит их увеличение вниз по профилю, при этом наблюдается снижение содержания мелких частиц (менее 1 мм), и соответственно снижается содержание физической глины в почве. Почвогрунт по гранулометрическому составу характеризуется как супесь.

Проведенные исследования показали, что на участке № 1 происходит постепенное увеличение плотности сложения вниз по профилю. Верхний, корнеобитаемый слой почвогрунта характеризуется как среднеплотный (плотность – 1,28–1,32 г/см<sup>3</sup>), а его пористость оценивается как удовлетворительная. Суглинистый горизонт на участке характеризуется как плотный (плотность – 1,34–1,46 г/см<sup>3</sup>), а пористость – низкая. Подстилающие породы, представленные смесью вскрышных и вмещающих пород, по плотности сложения характеризуются как очень плотные (плотность – 1,75–1,94 г/см<sup>3</sup>), пористость данных горизонтов оценивается как чрезмерно низкая.

Верхний 10-сантиметровый слой участка № 2 по плотности сложения характеризуется как плотный и составляет 1,32–1,42 г/см<sup>3</sup>. Ниже по профилю отмечается увеличение плотности до 1,55–1,83 г/см<sup>3</sup>, слой характеризуется как очень плотный. Пористость всего почвенного профиля характеризуется как чрезмерно низкая.

Таблица 2. Гранулометрический состав участков рекультивации

Table 2. Reclamation sites: granulometry

№ участка	Глубина, см	Доля фракций диаметром (мм), %				
		>10	10–5	5–3	3–1	< 1
1	0–5	0	0	0	16	84
	5–10	0	0	0	9	91
	10–40	0	0	0	10	90
	40–80	1	1	2	28	68
	80–100	5	1	1	23	70
2	0–5	2	3	6	23	66
	5–10	3	2	6	31	58
	10–20	2	8	16	21	63
	20–40	3	1	2	30	64
	40–80	75	4	5	7	9
3	0–5	12	9	20	20	39
	5–10	16	27	19	19	19
	10–20	48	10	14	12	16
	20–30	32	11	14	10	33

Плотность сложения на участке № 3 верхнего 5-сантиметрового слоя характеризуется как плотная (1,38–1,40 г/см<sup>3</sup>), ниже по профилю отмечается ее увеличение (1,76–1,91 г/см<sup>3</sup>), и она характеризуется как очень плотная. Пористость всего профиля почвогрунта характеризуется как чрезмерно низкая.

Содержание органического вещества в верхнем горизонте почвенного покрова на участке № 1, представленного плодородным слоем, составляет от 3,5 до 5,5 %, данный тип почвы характеризуется как среднегумусовый. Ниже по профилю в горизонте, субстрат которого представлен потенциально-плодородными породами, а также смесью вскрышных и вмещающих пород, наблюдается резкое снижение содержания гумуса, и данный горизонт характеризуется как безгумусовый.

Почвогрунты участка № 2 с отсыпкой потенциально-плодородными породами по содержанию органического вещества, которое составляет менее 1 %, характеризуются как безгумусовые.

Содержание органического вещества на участке № 3 в верхнем 10-сантиметровом слое достигает 6,1 %, почва характеризуется как среднегумусовая. Ниже по профилю отмечается снижение содержания органического вещества до 2,4 %, слой характеризуется как низкогумусовый. Эти определения являются условными, т. к. анализ содержания органических веществ производился по углероду. Высокое содержание органического вещества на данном участке свидетельствует о наличии угольных частиц в профиле почвы.

Еще одним важным критерием, характеризующим почвенно-экологическое состояние исследуемых участков рекультивации, является обеспеченность почв биофильными элементами (азотом, фосфором и калием).

Проведенные исследования показали, что в верхнем гумусовом 20-сантиметровом слое на участке № 1 содержание нитратного азота составляет 109 мг/кг в верхней части профиля и 55 мг/кг – в нижней. Обеспеченность данного участка высокая, и потребность в азотном удобрении отсутствует.

На участках с отсыпкой суглинком отмечается низкое содержание нитратного азота (5,5–6,5 мг/кг), а с глубиной его содержание снижается до очень низкого. Потребность данных участков в азотных удобрениях велика.

Содержание нитратного азота в верхнем слое на участке № 3 имеет достаточно высокие значения (15,5–17,4 мг/кг), следовательно потребность в азотных удобрениях отсутствует. Ниже по профилю содержание азота в почвогрунте снижается и характеризуется как среднее. Возможно, наличие соединений азота в слое, образованном вскрышными породами, связано с проведением взрывных работ.

Верхний гумусовый горизонт участка № 1 характеризуется средним содержанием подвижного фосфора и составляет от 59 до 88 мг/кг, вниз по профилю отмечается его снижение до низкой обеспеченности.

Участок № 2 характеризуется низким содержанием подвижного фосфора по всему профилю. Его содержание не превышает 46,3 мг/кг.

Участок № 3 характеризуется средним содержанием подвижного фосфора по всему профилю.

В верхнем гумусовом горизонте участка № 1 содержится от 162 до 92 мг/кг обменного калия. Вниз по профилю наблюдается его снижение до 37–50 мг/кг. Таким образом, верхний гумусовый горизонт участка № 1 характеризуется средним содержанием обменного калия, а нижележащие горизонты – низким.

Содержание калия на участке № 2 изменяется от очень низкого, менее 50 мг/кг, до низкого 65 мг/кг.

Участок № 3, сформированный техногенным элювием, характеризуется низким содержанием подвижного калия.

Кислотность почвы влияет на жизнедеятельность микроорганизмов, активизируя одни группы и подавляя другие. От концентрации ионов водорода зависит уровень ферментативной активности почвы, связанной с микробиологическими процессами. Результатом этих процессов является изменение соотношения скоростей минерализации и гумификации растительного материала и, как следствие, темпов гумусонакопления.

Проведенные исследования показали, что верхний гумусовый горизонт участка № 1 характеризуется нейтральной реакцией почвенного раствора и его pH составляет 6,7–6,8. Нижележащие горизонты суглинка и техногенного элювия характеризуются щелочной реакцией почвенного раствора, их pH принимает значения в диапазоне 7,4–8,2.

Пробы почвы на участке с отсыпкой потенциально-плодородными породами характеризуются значениями pH почвенного раствора от слабощелочных (7,4–7,5) до щелочных (7,8–8,1).

Исследования почвенного покрова участка № 3, сложенного техногенным элювием, показали щелочную реакцию проб почву со значениями pH 7,6–8,3.

Емкость катионного обмена – один из важнейших показателей почвенного поглощающего комплекса, который характеризует катионообменную способность почв, т. е. количество катионов почвы, способных к обмену на катионы нейтральной соли. Емкость катионного обмена зависит от типа почвы, минералогического, гранулометрического состава, количества гумуса и реакции среды. Чем больше в почве глинистых минералов и гумуса, чем ближе к нейтральной реакция почвы, тем выше емкость катионного обмена.

Емкость катионного обмена на участке № 1 в верхнем 10-сантиметровом слое характеризуется как высокая и составляет от 20 до 27 мг-экв./100 г. Нижележащие горизонты, сложенные субстратом потенциально-плодородных пород и техногенным элювием, имеют более низкие значения емкости катионного обмена (11–16 мг-экв./100 г), которые характеризуются как средние.

На участке № 2 (с отсыпкой потенциально-плодородными породами) емкость катионного обмена верхнего 10-сантиметрового слоя характеризуется как высокая и составляет 24–31 мг-экв./100 г. В нижележащих слоях емкость катионного обмена изменяется от 11 до 31 мг-экв./100 г, т. е. от средней до высокой.

На участке № 3 (субстрат представлен техногенным элювием) емкость катионного обмена верхнего 10-сантиметрового слоя составляет 5–15 мг-экв./100 г, т. е. изменяется от низкой до средней. В нижележащих слоях емкость катионного обмена изменяется от 11 до 34 мг-экв./100 г, т. е. от средней до высокой.

Как уже отмечалось выше, после завершения разработки угольных разрезов на их месте остается огромная площадь с технологически измененным рельефом, практически лишенная растительности и, как правило, загрязненная токсичными веществами, в том числе тяжелыми металлами.

Проведенные исследования подвижных форм никеля, цинка, свинца, меди, хрома и кадмия (табл. 3) показали, что содержание этих элементов в исследуемых почвах не превышает предельно допустимых концентраций (ПДК) [23]. Единственным исключением является содержание никеля на участке № 3, почвенный покров которого сформирован смесью вскрышных и вмещающих пород.

В плодородном слое на участке № 1 отмечается незначительное увеличение количества кадмия по профилю в нижележащих горизонтах, представленных потенциально-плодородными породами и техногенным элювием. На участках № 2 и 3 концентрация кадмия не превышает 0,002 мг/кг. Содержание меди также низкое, и лишь в верхнем слое техногенного элювия достигает примерно трети ПДК.

Содержание свинца в почвах, представленных техногенным элювием, составляет от 2,5 до 3,5 мг/кг, а на участках с отсыпкой суглинком – 1,4–1,7 мг/кг, что не превышает значений ПДК. На участке № 1 его содержание не достигает 1 мг/кг.

Содержание цинка в исследуемых почвогрунтах, как видно из таблицы 3, тоже не превышает значений ПДК. Незначительным оказалось содержание ртути и мышьяка в образцах почвы.

Количество никеля в верхнем 5-сантиметровом слое участка № 3 составляет 7,4 мг/кг, что практически вдвое превышает значения ПДК, с глубиной отмечается снижение концентрации данного элемента до уровня, незначительно превышающего ПДК.

Для оценки изменения микроэлементного состава почвогрунта, произошедшего после завершения периода вегетации 2023 г., весной 2024 г., до начала нового периода вегетации, был проведен повторный анализ поверхностных корнеобитаемых слоев на всех экспериментальных участках.

Проведенные исследования содержания органического вещества в корнеобитаемых слоях почвенного покрова на экспериментальных участках показали, что на участке № 1 его среднее значение практически не изменилось и составило 5,1 %.

В почвогрунте участка № 2 (с отсыпкой потенциально плодородными породами) заметно увеличилось содержание органического вещества, значение которого достигло 1,7 %, что, очевидно, связано с попаданием в него органических веществ растений предыдущего периода вегетации.

Содержание органического вещества в верхнем слое участка № 3 уменьшилось до 1,5 %. Возможно, как отмечалось выше, высокое содержание органического

Таблица 3. Содержание подвижных форм микроэлементов в почвогрунтах в начале лета 2023 г.

Table 3. Mobile microelements in soil samples, early summer 2023

№ участка	Глубина, см	Концентрация микроэлемента, мг/кг								
		Ni	Zn	Pb	Cu	Cr	Cd	Co	Hg	As
1	0–5	0,316	1,638	0,01	0,157	< 0,1	0,025	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	5–10	0,462	1,923	0,01	0,094	< 0,1	0,027	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	10–40	0,652	1,994	0,661	0,088	< 0,1	0,058	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	40–80	0,831	0,518	0,951	0,102	< 0,1	0,031	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	80–100	1,446	1,628	1,166	0,390	< 0,1	0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
2	0–5	1,661	0,216	1,63	<0,001	< 0,1	<0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	5–10	1,775	0,406	1,574	<0,001	< 0,1	<0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	10–20	1,724	0,19	1,468	<0,001	< 0,1	<0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	20–40	1,724	0,221	1,417	<0,001	< 0,1	<0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	40–80	1,817	1,173	1,709	0,063	< 0,1	<0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
3	0–5	7,362	3,875	3,504	1,054	< 0,1	< 0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	5–10	5,201	2,030	2,769	0,357	< 0,1	< 0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	10–20	3,929	1,912	2,486	0,364	< 0,1	< 0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
	20–30	4,201	1,729	2,677	0,391	< 0,1	< 0,002	< 0,002	< 0,1	< 0,1
Предельно допустимая концентрация		4,0	23,0	6,0	3,0	6,0	1,0	5,0	2,1	2,0

вещества, обнаруженное в предыдущем исследовании, было связано с угольной пылью, присутствовавшей в почве, сформированной вскрышными породами. Эрозионные процессы могли привести к вымыванию угольных частиц. Эти выводы являются условными, т. к. анализ содержания органических веществ производился по углероду.

Проведенные исследования показали, что в верхнем слое на участке № 1 содержание общего азота составляет 70 мг/кг. Содержание общего азота в верхних слоях почвы участков № 2 и № 3 заметно увеличилось и достигло 50 мг/кг.

Верхний гумусовый горизонт участка № 1 характеризуется средним содержанием подвижного фосфора и составляет в среднем 70 мг/кг. Участок № 2 характеризуется низким содержанием подвижного фосфора – в среднем 35 мг/кг. Участок № 3 характеризуется самым высоким содержанием подвижного фосфора – в среднем 120 мг/кг.

В верхнем гумусовом горизонте участка № 1 содержится 142 мг/кг обменного калия. Содержание калия на участках № 2 и № 3 составляет 139 и 139 мг/кг соответственно, что заметно превышает предыдущие значения.

Исследования показали, что верхние слои почвогрунта на всех участках характеризуются щелочной реакцией почвенного раствора и их pH принимает значения в диапазоне 7,9–8,4.

Емкость катионного обмена на участке № 1 в верхнем слое характеризуется как высокая и составляет 35,7 мг-экв./100 г. Еще более высокое значение емкости катионного обмена получено для образцов верхнего слоя почвогрунта на участке № 2 – 39,7 мг-экв./100 г. На участке № 3 емкость катионного обмена верхнего слоя составляет 27,8 мг-экв./100 г.

Для анализа образцов почвы на содержание тяжелых металлов были выбраны лишь те элементы, которые по итогам предыдущего анализа микроэлементного состава обнаружены в почве в значимых количествах. Образцы грунта отбирались в нескольких точках каждого участка из слоев глубиной до 50 см на участках № 1 и 2 и глубиной до 20 см на участке № 3. Образцы с каждого участка тщательно перемешивались,

Таблица 4. Содержание подвижных форм микроэлементов в почвогрунтах весной 2024 г.

Table 4. Mobile microelements in soil samples, spring 2024

Концентрация микроэлемента, мг/кг				
Ni	Zn	Pb	Cu	Cd
Участок № 1				
1,75	1,23	2,50	< 0,1	< 0,1
Участок № 2				
2,12	< 1,0	2,54	< 0,1	< 0,1
Участок № 3				
2,64	< 1,0	< 1,0	< 0,1	< 0,1

после чего отбирались экспериментальные пробы. Результаты анализа представлены в таблице 4.

Данные таблицы 4 свидетельствуют, что значения концентраций металлов изменились разнонаправленно. Но общая тенденция соответствует выравниванию концентраций. На наш взгляд, этот процесс может быть обусловлен эрозией элементов и их перераспределением водными потоками между различными участками.

Можно отметить заметное повышение концентраций никеля, цинка и свинца в почве участков № 1 и № 2, а также понижение концентраций этих элементов в прикорневых слоях участка № 3. Для наглядности на рисунке 2 представлены сравнительные гистограммы содержания некоторых тяжелых металлов в почве. Для сравнения результаты анализа проб почвы 2023 г. усреднялись по глубине.

Как видно из рисунка 2, содержание тяжелых металлов в почве участков № 1 и № 2 через год выросло. Этот факт легко объясним. Дело в том, что, как описывалось выше, верхние слои этих участков формировались отсыпкой потенциально-плодородного и плодородного слоев почвы, завезенных из-за пределов отвала. Через год диффузионные и конвекционные процессы за счет грунтовых вод привели к перераспределению подвижных форм металлов. Следует отметить, что содержание тяжелых металлов нигде не превышало ПДК, за исключением содержания никеля на участке № 3 в образцах 2023 г. На участке № 3, образованном вскрышными породами угольного карьера, заметно существенное снижение содержания тяжелых металлов в почве. Этот факт можно по крайней мере частично объяснить процессами фиторемедиации.

Ниже представлены результаты анализа растительной массы, собранной осенью 2023 г. Следует отме-

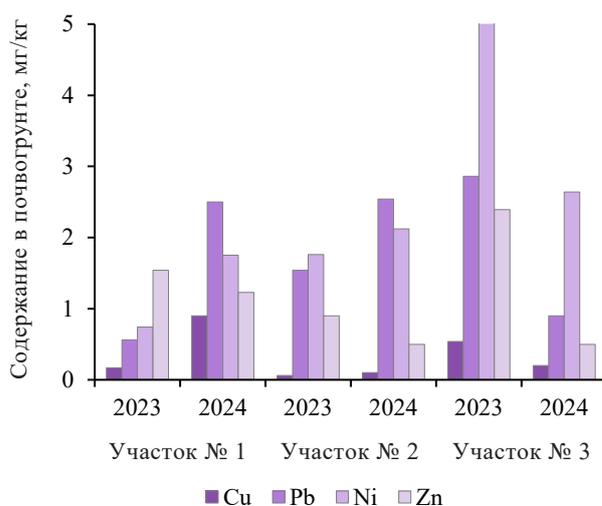


Рисунок 2. Сравнительный анализ содержания тяжелых металлов по годам в образцах почвогрунта  
Figure 2. Comparative chronological analysis of heavy metals in soil samples

титель, что посев трав осуществлялся лишь в июле, после оформления всех документов и получения разрешений для работы на научно-техническом полигоне. Период вегетации продолжался до начала октября.

Для бобовых культур на участке № 1 были получены следующие данные. Содержание (массовая доля) в растительной массе азота (4,07 %), фосфора (0,29 %), калия (5,62 %) не отличается от средних показателей травянистой растительности сенокосов и пастбищ. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 0,51, кадмия – менее 0,1, меди – 6,3, цинка – 13,8, марганца – 85 мг/кг – не превышает максимально допустимый уровень (МДУ) [24] химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 15,6 %. Содержание железа – 350 мг/кг в абсолютно сухом веществе. Содержание железа в пересчете на естественную влажность растительности составило 54,6 мг/кг, что не превышает МДУ (100 мг/кг) по содержанию железа в кормах.

На участке № 2 содержание азота (3,23 %), фосфора (0,28 %), калия (4,47 %) не отличается от средних показателей травянистой бобовой растительности. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 0,74, кадмия – менее 0,1, меди – 5,7, цинка – 11,4, марганца – 65 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 15,77 %. Содержание железа в пересчете на естественную влажность – 43,5 мг/кг.

На участке № 3 содержание азота (3,29 %), фосфора (0,25 %), калия (4,55 %) не отличается от средних показателей. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 0,63, кадмия – менее 0,1, меди – 3,7, цинка – 10,5, марганца – 147 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 17,25 %. Содержание железа в пересчете на естественную влажность растительности составило 51,6 мг/кг.

Для злаковых растений на участке № 1 содержание в растительной массе азота (1,73 %), фосфора (0,26 %), калия (5,53 %) не отличается от средних показателей травянистой растительности сенокосов и пастбищ. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 0,84, кадмия – менее 0,1, меди – 3,3, цинка – 10,2, марганца – 129 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 18,54 %. Содержание железа в пересчете на естественную влажность растительности составило 92,7 мг/кг, что сопоставимо с МДУ (100 мг/кг) по содержанию железа в кормах.

На участке № 2 для злаковых трав содержание азота (1,18 %), фосфора (0,23 %), калия (3,89 %) не отличается от средних показателей травянистой растительности. Содержание тяжелых металлов в абсолютно

сухом веществе растительной массы: свинца – 0,65, кадмия – менее 0,1, меди – 4,2, цинка – 9,9 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 24,11 %. Содержание марганца в пересчете на естественную влажность растительности составило более 241 мг/кг, что значительно превышает МДУ (100 мг/кг) по содержанию марганца в кормах. Содержание железа в пересчете на естественную влажность – 111,4 мг/кг, что немного превышает МДУ.

На участке № 3 в растительной массе злаковых трав содержание азота (1,42 %), фосфора (0,19 %), калия (5,02 %) также не отличается от средних показателей травянистой растительности. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 0,64, кадмия – менее 0,1, меди – 4,5, цинка – 16,5 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 24,64 %. Содержание марганца в пересчете на естественную влажность растительности составило 141 мг/кг, что почти в 1,5 раза превышает МДУ по содержанию марганца в кормах. Содержание железа в пересчете на естественную влажность – 85,76 мг/кг, что близко к МДУ для железа.

Для оценки изменения содержания тяжелых металлов в растительной массе бобовых и зерновых травянистых культур, произошедшего в течение периода вегетации 2024 г., осенью 2024 г. был проведен повторный анализ содержания тяжелых металлов в растительной массе на всех экспериментальных участках.

Для бобовых культур на участке № 1 были получены следующие данные. Содержание (массовая доля) в растительной массе азота (2,69 %), фосфора (0,31 %), калия (1,91 %) не отличается от средних показателей травянистой растительности сенокосов и пастбищ. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 1,54, кадмия – менее 0,19, меди – 5,7, цинка – 20,4, марганца – 85 мг/кг – не превышает МДУ [24] химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 25,7 %. Содержание железа – 568 мг/кг в абсолютно сухом веществе, марганца – 32 мг/кг, что не превышает МДУ по содержанию железа и марганца в кормах.

На участке № 2 содержание азота (1,06 %), фосфора (0,18 %), калия (1,46 %) также не отличается от средних показателей травянистой бобовой растительности. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 5,22, кадмия – 0,32, меди – 9,7, цинка – 27,6, марганца – 312 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 27,7 %. Содержание железа в пересчете на естественную влажность растительности (> 250 мг/кг) существенно превышает МДУ (100 мг/кг) по содержанию железа в кормах.

На участке № 3 содержание азота (2,06 %), фосфора (0,23 %), калия (1,5 %) не отличается от средних показателей травянистой растительности сенокосов и пастбищ. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 1,98, кадмия – менее 0,22, меди – 6,5, цинка – 21,8, марганца – 85 мг/кг – не превышает МДУ [24] химических элементов в кормах для животных. Массовая доля сухого вещества – 25,7 %. Содержание железа – более 1000 мг/кг в абсолютно сухом веществе. Содержание железа в пересчете на естественную влажность растительности (> 250 мг/кг) существенно превышает МДУ (100 мг/кг) по содержанию железа в кормах.

Для злаковых растений на участке № 1 содержание в растительной массе азота (2,68 %), фосфора (0,31 %), калия (3,36 %) не отличается от средних показателей травянистой растительности сенокосов и пастбищ. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 0,35, кадмия – 0,15, меди – 2,6, цинка – 16,7, марганца – 101, железа – 293 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 14,3 %.

На участке № 2 для злаковых трав содержание азота (1,12 %), фосфора (0,17 %), калия (2,04 %) не отличается от средних показателей травянистой растительности. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 2,64, кадмия – 0,13, меди – 8,7, цинка – 19,6, марганца – 126 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 22,48 %. Содержание железа в пересчете на естественную влажность – 147 мг/кг, что почти в 1,5 раза превышает МДУ.

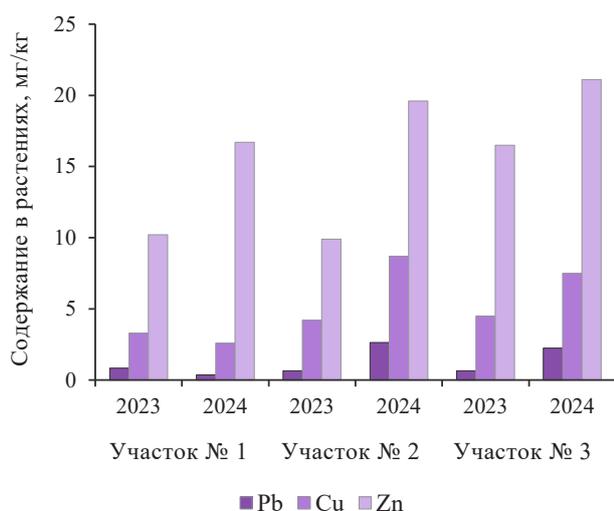


Рисунок 3. Сравнительный анализ содержания тяжелых металлов по годам в образцах злаковых растений

Figure 3. Comparative chronological analysis of heavy metals in cereals

На участке № 3 в растительной массе злаковых трав содержание азота (2,09 %), фосфора (0,25 %), калия (2,79 %) также не отличается от средних показателей травянистой растительности. Содержание тяжелых металлов в абсолютно сухом веществе растительной массы: свинца – 2,24, кадмия – 0,25, меди – 7,5, цинка – 21,1, марганца – 27,7 мг/кг – не превышает МДУ химических элементов в кормах для сельскохозяйственных животных. Массовая доля сухого вещества – 20,12 %. Содержание железа в пересчете на естественную влажность – более 200 мг/кг, что более чем в 2 раза превышает МДУ для железа.

Высокое содержание железа и марганца в некоторых образцах растительной массы, видимо, связано с тем, что в почвообразующих породах в геологическом фундаменте Кузбасса всегда много железа и марганца.

На рисунке 3 представлены сравнительные гистограммы содержания некоторых тяжелых металлов в растительной массе злаковых растений к концу периодов вегетации 2023 и 2024 г. Рисунок 4 иллюстрирует сравнительные гистограммы содержания некоторых тяжелых металлов в растительной массе бобовых растений к концу периодов вегетации 2023 и 2024 г.

На наш взгляд, заметное увеличение содержания металлов в образцах растительной массы 2024 г. связано, прежде всего, с увеличением периода вегетации растений. Хотя нельзя исключать и повышение способности растений к аккумуляции ряда веществ. Можно отметить более высокую способность бобовых растений к аккумуляции цинка. В среднем способности к аккумуляции различных тяжелых металлов для бобовых и злаковых растений вполне сравнимы. Однако следует учитывать, что приведен-

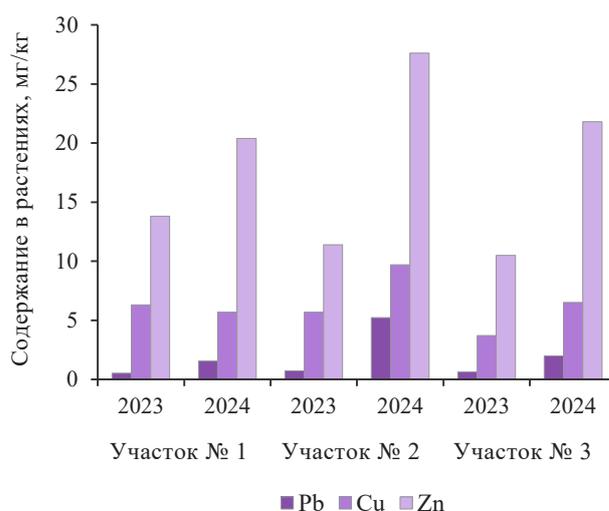


Рисунок 4. Сравнительный анализ содержания тяжелых металлов по годам в образцах бобовых растений

Figure 4. Comparative chronological analysis of heavy metals in legumes

ные данные относятся к содержанию металлов в сухом веществе. Учитывая, что содержание сухих веществ у злаковых растений заметно ниже (15–20 %), чем у бобовых (25–30 %), можно говорить о большей способности к накоплению металлов у злаковых растений в пересчете на единицу биомассы при естественной влажности.

#### **Выводы**

Двухлетний опыт наблюдения за накоплением тяжелых металлов в бобовых и злаковых травянистых растениях подтвердил их способность к фиторемедиации при использовании в качестве материалов для проведения биологической рекультивации техногенно нарушенных территорий. Безусловно, процесс фиторемедиации в значительной степени подвержен влиянию многочисленных факторов, сопутствующих процессу рекультивации, таких как формирование почвообитаемого слоя, гидродинамические особенности территории, эрозионные процессы и др.

Травянистые растения снижают концентрацию тяжелых металлов в почвах, формирующихся из вскрышных пород угольного разреза. Как показали эксперименты, бобовые и злаковые культуры обладают доста-

точно высоким фиторемедиационным потенциалом по отношению к таким элементам, как свинец, кадмий, цинк, никель, медь, марганец и железо.

Данные, полученные в результате исследования, могут быть полезны для специалистов, занимающихся проблемами рекультивации территорий выработанных угольных разрезов.

#### **Критерии авторства**

Авторы заявляют о равнозначном вкладе в подготовку и написание статьи.

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### **Contribution**

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

#### **Conflict of interest**

The authors declared no conflict of interests regarding the publication of this article.

#### **References/Список литературы**

1. Gavrillov VL, Nemova NA, Reznik AV, Kosarev NS, Kolesnikov AA. On the need for a comprehensive geoecological assessment of lands disturbed by mining. *Bulletin of the Tomsk Polytechnic University. Geo Assets Engineering*. 2023;334(10):76–87. (In Russ.). <https://doi.org/10.18799/24131830/2023/10/4212>; <https://elibrary.ru/YMLJFC>
2. César RG, Belel L, Badari CG, Viani RAG, Gutierrez V, Chazdon RL, *et al.* Forest and Landscape Restoration: A Review Emphasizing Principles, Concepts, and Practices. *Land*. 2021;10(1):28. <https://doi.org/10.3390/land10010028>
3. Asyakina LK, Dyshlyuk LS, Prosekov AY. Reclamation of Post-Technological Landscapes: International Experience. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(4):805–818. (In Russ.). <http://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-805-818>; <https://elibrary.ru/SANMZI>
4. Waitkus AK. Sustainable reclamation practices for a large surface coal mine in shortgrass prairie, semiarid environment (Wyoming, USA): case study. *International Journal of Coal Science and Technology*. 2022;9:32. <https://doi.org/10.1007/s40789-022-00502-3>
5. Osintseva MA, Kryuk VA, Dyukova EA, Burova NV. Creation of artificial vegetation cover on technogenically disturbed landscapes. *Ugol*. 2023;(S12):56–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.18796/0041-5790-2023-S12-56-62>; <https://elibrary.ru/nkxqek>
6. Dyukova EA, Ulyanova EG, Osintseva MA, Kryuk VA. Agricultural Technology for Phytophage and Phytopathogen Resistant Planting Material. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(4):807–815. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2480>
7. Atuchin VV, Asyakina LK, Serazetdinova YR, Frolova AS, Velichkovich NS, Prosekov AY. Microorganisms for Bioremediation of Soils Contaminated with Heavy Metals. *Microorganisms*. 2023;11(4):864. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040864>
8. Ashraf S, Ali Q, Zahir ZA, Ashraf S, Asghar HN. Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;174:714–727. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.068>
9. Fotina NV, Emelianenko VP, Vorob'eva EE, Burova NV, Ostapova EV. Contemporary Biological Methods of Mine Reclamation in the Kemerovo Region – Kuzbass. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(4):869–882. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-869-882>; <https://elibrary.ru/DPWUJJ>
10. Azizi M, Faz A, Zornoza R, Martinez-Martinez S, Acosta JA. Phytoremediation Potential of Native Plant Species in Mine Soils Polluted by Metal(loid)s and Rare Earth Elements. *Plants*. 2023;12(6):1219. <https://doi.org/10.3390/plants12061219>

11. Shakeel T, Shah GM, Zeb BS, Gul I, Bibi S, Hussain Z, et al. Phytoremediation potential and vegetation assessment of plant species growing on multi-metals contaminated coal mining site. Environmental Research Communications. 2024;6:055006. <https://doi.org/10.1088/2515-7620/ad4320>
12. Zaykova EYu, Feofanova SS. Phytoremediation potential of green spaces in the city. Vestnik MGSU. 2024;19(5): 685–712. (In Russ.). <https://doi.org/10.22227/1997-0935.2024.5.685-712>; <https://elibrary.ru/CDNGFF>
13. Akhtar O, Kehri HK, Zoomi I. Arbuscular mycorrhiza and *Aspergillus terreus* inoculation along with compost amendment enhance the phytoremediation of Cr-rich technosol by *Solanum lycopersicum* under field conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2020;201:110869. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110869>
14. Marchiol L, Fellet G, Perosa D, Zerbi G. Removal of trace metals by *Sorghum bicolor* and *Helianthus annuus* in a site polluted by industrial wastes: A field experience. Plant Physiology and Biochemistry. 2007;45(5):379–387. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.03.018>
15. Shah V, Daverey A. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. Environmental Technology and Innovation. 2020;18:100774. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>
16. Sanami NL, Ghorbani J, Vahabzadeh G, Hodjati S M, Motesarezadeh B. Spontaneous growth of plants enhances phytoextraction on abandoned coal mine wastes in Central Alborz coalfield, Iran. International Journal of Phytoremediation. 2024;26(13):2154–2162. <https://doi.org/10.1080/15226514.2024.2378217>
17. Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. Journal of Chemistry. 2019;6730305. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
18. Wang L, Rinklebe J, Tack FMG, Hou D. A review of green remediation strategies for heavy metal contaminated soil. Soil Use Manage. 2021;37(4):936–963. <https://doi.org/10.1111/sum.12717>
19. Ahmad Z, Khan SM, Page SE, Balzter H, Ullah A, Ali S, et al. Environmental sustainability and resilience in a polluted ecosystem via phytoremediation of heavy metals and plant physiological adaptations. Journal of Cleaner Production. 2023;385:135733. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135733>
20. Osintseva MA, Dyukova EA, Burova NV, Osintsev AM. Influence of relief features and erosion processes on efficiency of biological reclamation of lands technologically changed by coal mining enterprises. Ugol. 2024(7):100–105. (In Russ.). <https://doi.org/10.18796/0041-5790-2024-7-100-105>; <https://elibrary.ru/DLRJSC>
21. Guidelines for assessing the level of heavy metals contamination in agricultural soils and plant products. (In Russ.). [Internet]. [cited 2024 June 30]. Available from: <https://docs.cntd.ru/document/1200078918>
22. Guidelines for photometric assessment of arsenic contamination in soil. (In Russ.). [Internet]. [cited 2024 June 30]. Available from: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293771/4293771887.pdf>
23. Sanitary rules and regulations. Maximum permissible concentrations of heavy metals and arsenic in food raw materials and foods. (In Russ.). [Internet]. [cited 2024 June 30]. Available from: <https://docs.cntd.ru/document/1200114682>
24. Sanitary rules and regulations SanPiN 2.1.7.573-96. Temporary maximum permissible level of some chemical elements in feed for farm animals. (In Russ.). [Internet]. [cited 2024 June 30]. Available from: <https://base.garant.ru/4174947/dd3165cca2aa805c6f0e2dc02a2ade62>

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Техника и технология пищевых производств (Food Processing: Techniques and Technology)» предназначен для публикации статей, посвященных проблемам пищевой и смежных отраслей промышленности.

Статья должна отвечать профилю журнала, обладать научной новизной, публиковаться впервые.

Рукопись научной статьи, поступившая в редакцию журнала, рассматривается ответственным за выпуск на предмет соответствия профилю журнала и требованиям к оформлению, проверяется оригинальность представленного текста с помощью интернет-ресурсов – <https://antiplagiat.ru>, регистрируется.

В журнале публикуются только рукописи, текст которых рекомендован рецензентами. Редакция организует «двухстороннее слепое» (анонимное) рецензирование представленных рукописей. Выбор рецензента осуществляется решением главного редактора или его заместителя. Для проведения рецензирования рукописей статей в качестве рецензентов могут привлекаться как члены редколлегии журнала «Техника и технология пищевых производств (Food Processing: Techniques and Technology)», так и высококвалифицированные ученые и специалисты других организаций и предприятий, обладающие глубокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению, как правило, доктора наук, профессора. Все рецензенты являются признанными специалистами по тематике рецензируемых материалов и имеют в течение последних 3 лет публикации по тематике рецензируемой статьи.

Рецензенты уведомляются о том, что присланные им рукописи являются частной собственностью авторов и относятся к сведениям, не подлежащим разглашению. Рецензентам не разрешается делать копии статей для своих нужд. Рецензирование проводится конфиденциально. Нарушение конфиденциальности возможно только в случае заявления рецензента о недостоверности или фальсификации материалов, изложенных в статье.

Срок рассмотрения статьи не должен превышать трех месяцев со дня получения статьи на рецензирование.

Оригиналы рецензий хранятся в издательстве и в редакции издания в течение пяти лет со дня публикации статей.

Если в рецензии имеется указание на необходимость ее исправления, то статья направляется автору на доработку.

Если статья по рекомендации рецензента подверглась значительной авторской переработке, то она направляется

на повторное рецензирование тому же рецензенту, который сделал критические замечания.

Редакция оставляет за собой право отклонения статей в случае неспособности или нежелания автора учесть пожелания редакции.

При наличии отрицательных рецензий на рукопись от двух разных рецензентов или одной рецензии на ее доработанный вариант статья отклоняется от публикации без рассмотрения другими членами редколлегии. Автору не принятой к публикации статьи ответственный за выпуск направляет мотивированный отказ. Фамилия рецензента может быть сообщена автору лишь с согласия рецензента.

Решение о возможности публикации после рецензирования принимается главным редактором, а при необходимости – редколлегией в целом.

С 1 августа 2024 г. для публикации статьей необходимо вносить плату (АРС). Плата за публикацию одной статьи составляет 50 000 руб. независимо от объема рукописи, языка, на котором она представлена, и наличия графического материала. Оплата производится только после получения положительной рецензии и утверждения главным редактором статьи в номер. За подачу рукописи статьи в редакцию журнала, её проверку и рецензирование плата не взимается. Более подробно ознакомиться с условиями платы, скидками и привилегиями можно на <https://fppt.ru>

Редакция журнала направляет авторам представленных материалов копии рецензий или мотивированный отказ, а также обязуется направлять копии рецензий в Министерство науки и высшего образования Российской Федерации при поступлении в редакцию издания соответствующего запроса.

Редакция журнала «Техника и технология пищевых производств (Food Processing: Techniques and Technology)» не хранит рукописи, не принятые к печати.

Рукописи печатаются, как правило, в порядке очередности их поступления в редакцию. В исключительных случаях, редакционная коллегия имеет право изменить очередность публикации статей.

Журнал «Техника и технология пищевых производств (Food Processing: Techniques and Technology)» является журналом открытого доступа (open access). Все материалы журнала распространяются на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

## ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЬИ

Объем статьи должен быть не менее 35–40 тыс. знаков (не включая списки литературы на русском и английском языках). Объем обзорной рукописи – более 40 тыс. знаков.

Оформление текста (форматирование): поля по 20 мм, одинарный интервал без переносов, лишние пробелы и абзацные интервалы, шрифт Times New Roman, 10 кегль. Следует избегать перегрузки статей большим количеством формул, дублирования одних и тех же результатов в таблицах и графиках.

Графики, диаграммы и т. п. (желательно цветные), созданные средствами Microsoft Office и Corel Draw, должны допускать возможность редактирования и направляются в редакцию отдельными файлами в форматах tiff, jpeg, cdr, excel.

Каждая таблица, график, диаграмма и т. п. должны иметь заголовки и порядковые номера, в тексте статьи должны присутствовать ссылки на каждую из них.

### Структура статьи:

1. Тип статьи;
2. Название статьи;
3. Инициалы и фамилии всех авторов;
4. Официальное полное название учреждения;
5. E-mail автора, с которым следует вести переписку;
6. Аннотация (разбивается на разделы: «Введение», «Объекты и методы исследований», «Результаты и их обсуждение», «Выводы»);
7. Ключевые слова;
8. Финансирование;

9. Текст статьи (обязательные разделы: «Введение», «Объекты и методы исследований», «Результаты и их обсуждение», «Выводы»);

10. Критерий авторства;

11. Конфликт интересов;

12. Благодарности;

13. Список литературы;

14. References;

15. Сведения об авторах (на русском и английском языках).

Подать рукопись можно на сайте журнала <https://fppt.ru> или отправив на e-mail [fppt98@gmail.com](mailto:fppt98@gmail.com)

### В редакцию предоставляются:

1. Электронная версия статьи в программе MSWord. Файл статьи следует назвать по фамилии первого автора – ПетровГП.doc. Не допускается в одном файле помещать несколько документов;
2. Сканированная электронная версия статьи, подписанная всеми авторами, в программе PDF. Файл статьи следует назвать по фамилии первого автора – ПетровГП.pdf. Не допускается в одном файле помещать несколько документов;
3. Гарантийное письмо (скан-копия) на имя главного редактора журнала на бланке направляющей организации с указанием даты регистрации и исходящего номера, с заключением об актуальности работы и рекомендациями к опубликованию, с подписью руководителя учреждения;
4. Издательский лицензионный договор.

Более подробная информация на <https://fppt.ru>

## ❧ СОДЕРЖАНИЕ ❧

<i>Рябцева С. А., Шпак М. А., Лодыгин А. Д., Серов А. В., Сазанова С. Н., Скороходова М. В., Ромахова В. Ю.</i> Биосинтез лактулозы с использованием ферментов лактозосбраживающих микромицет и бактерий ..... 645	<i>Перевозчикова М. А., Окулова И. И., Сергеев А. А., Домский И. А., Ширяев В. В., Дворников М. Г., Зарубин Б. Е.</i> Морфогистологическая структура печени оленевых ( <i>Cervidae</i> ) как индикатор благополучия их популяций ..... 756
<i>Попова Е. А., Пунгин А. В., Пантюхина А. П., Крель О. В.</i> Оценка содержания вторичных метаболитов и антиоксидантной активности экстрактов каллусных культур и микрорастений <i>in vitro</i> <i>Hyssopus officinalis</i> L. .... 658	<i>Короткая Е. В., Короткий И. А., Васильев К. И., Ефремов Д. А.</i> Закономерности массообменных процессов при криоконцентрировании обезжиренного молока ..... 781
<i>Симоненко Е. С., Симоненко С. В., Бегунова А. В., Петров А. Н., Семенова Е. С.</i> Оценка <i>in vivo</i> биологических эффектов нового кисломолочного продукта на основе кобыльего молока ..... 675	<i>Гниломедова Н. В., Весютова А. В., Аникина Н. С., Ермихина М. В., Олейникова В. А.</i> Мониторинг подлинности и качества концентрированного виноградного сусла ..... 794
<i>Смирнова А. В., Тихонов С. Л.</i> Идентификация и предиктивный анализ аминокислотных паттернов, обуславливающих потенциальную антигиперурикемическую активность пептидов ..... 687	<i>Яргатти Р., Мулей А.</i> Органолептическая оценка традиционных индийских десертов с добавлением сиропа агавы ..... 808
<i>Хан М., Рана С., Рана Д., Джони Э., Арифин Ш., Джубайер Ф., Алим А.</i> Физико-химические свойства арахисовой пасты с добавлением кокосовой муки и сухого молока ..... 702	<i>Фасхутдинова Е. Р., Богачёва Н. Н., Бородина Е. Е., Позднякова А. В., Лузянин С. Л.</i> Применение эндофитных микроорганизмов для интенсификации ростовых процессов сельскохозяйственных культур ..... 820
<i>Мартеха А. Н., Торопцев В. В., Каверина Ю. Е., Короткий И. А.</i> Влияние молочных компонентов на реологические свойства пшеничного теста и оценка его пригодности для 3D-печати ..... 711	<i>Морозова Е. А., Котов Р. М., Пастухова Е. Я., Егорова Н. М.</i> Произвольственный риск снижения качества жизни населения региона ..... 837
<i>Мельникова Е. И., Богданова Е. В., Станиславская Е. Б., Рудниченко Е. С., Чекареева М. С.</i> Применение концентрата мицеллярного казеина в производстве твердых сычужных сыров ..... 722	<i>Гиро Т. М., Ильина Л. А.</i> Влияние обогащенных рационов на состав и функциональный профиль микробиома рубца баранчиков ..... 848
<i>Табакаева О. В., Табакаев А. В., Приходько Ю. В., Владыкина Т. В., Капуста С. В.</i> Сверхкритические экстракты бурых водорослей в технологии рыбных консервов ..... 731	<i>Молибога Е. А., Леушкина В. В.</i> Аргументированный выбор основных направлений в работе со штаммом <i>Limnospira fusiformis</i> из озера Соленого (г. Омск) ..... 872
<i>Блиадзе В. Г., Ярышев В. Ю., Николаев А. Л.</i> Ультразвуковое ускорение отстаивания жира в молоке ..... 745	<i>Кротова М. Г., Гришаева И. Н.</i> Коллаген, гидролизированный из сырья маралов: технология получения и биохимический состав ..... 884
	<i>Осинцева М. А., Дюкова Е. А., Ульянова Е. Г., Осинцев А. М.</i> Изучение способности аккумуляции тяжелых металлов растениями в процессе рекультивации отвала угольного разреза ..... 897

## ❧ CONTENTS ❧

<i>Ryabtseva Svetlana A., Shpach Maria A., Lodygin Aleksei D., Serov Alexander V., Sazanova Serafima N., Skorokhodova Marina V., Romakhova Vera Yu.</i> Lactulose Biosynthesis with Enzymes of Lactose-Fermenting Micromycetes and Bacteria ..... 646	<i>Perevozchikova Maria A., Okulova Iraida I., Sergeyev Alexey A., Domskiy Igor A., Shiryaev Valeriy V., Dvornikov Mikhail G., Zarubin Boris E.</i> Morphohistological Structure of Liver in Wild Deer ( <i>Cervidae</i> ) as Indicator of Population Well-Being ..... 757
<i>Popova Elena A., Pungin Artem V., Pantyukhina Anastasia P., Krol Olesya V.</i> Evaluating Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of <i>in vitro</i> Callus and Micro-Plant Extracts of <i>Hyssopus officinalis</i> L. .... 659	<i>Korotkaya Elena V., Korotkiy Igor A., Vasiliev Kirill I., Efremov Denis A.</i> Mass Transfer Patterns during Low-Temperature Concentration of Skim Milk ..... 782
<i>Simonenko Elena S., Simonenko Sergey V., Begunova Anna V., Petrov Andrey N., Semenova Elena S.</i> New Functional Fermented Mare's Milk Product: Biological Assessment <i>in vivo</i> ..... 676	<i>Gnilomedova Nonna V., Vesjutova Antonina V., Anikina Nadezhda S., Ermikhina Marianna V., Oleinikova Veronica A.</i> Monitoring Authenticity and Quality of Concentrated Grape Must ..... 795
<i>Smirnova Anastasia V., Tikhonov Sergey L.</i> Amino Acid Patterns that Determine Antihyperuricemic Activity of Peptides: Identification and Predictive Analysis ..... 688	<i>Yargatti Rizwan, Muley Arti.</i> Agave Syrup in Traditional Indian Desserts: A Sensory Evaluation ..... 807
<i>Khan Momin, Rana Suman, Rana Juwel, Jony Entaduzzaman, Arifin Shoaib, Jubayer Fahad, Alim Abdul.</i> Effects of Coconut Flour and Milk Powder Supplementation on the Physicochemical Properties of Peanut Butter ..... 701	<i>Faskhutdinova Elizaveta R., Bogacheva Natalia N., Borodina Ekaterina E., Pozdnyakova Anna V., Luzyanin Sergey L.</i> Effect of Endophytic Microorganisms on Growth Rate of Crops ..... 821
<i>Martekha Alexander N., Toroptsev Vasilii V., Kaverina Yuliya E., Korotkiy Igor A.</i> The Influence of Dairy Components on the Rheological Properties of Wheat Dough and Assessment of its Suitability for 3D Printing ..... 712	<i>Morozova Elena A., Kотов Roman M., Pastukhova Elena Ya., Egorova Natalia M.</i> Food Risks as an Indicator of the Quality of Life in the Region ..... 838
<i>Melnikova Elena I., Bogdanova Ekaterina V., Stanislavskaya Ekaterina B., Rudnichenko Elena S., Chekmareva Mariya S.</i> Micellar Casein Concentrate in Hard Cheese Production ..... 723	<i>Giro Tatiana M., Ilina Larisa A.</i> Effect of Diet Supplements on Rumen Microbiome in Young Ram ..... 849
<i>Tabakaeva Oksana V., Tabakaev Anton V., Prikhodko Yury V., Vladykina Tatyana V., Kapusta Svetlana V.</i> Effect of Supercritical Extracts of Brown Algae on Fish Preserves ..... 732	<i>Moliboga Elena A., Leushkina Viktoriya V.</i> <i>Limnospira fusiformis</i> from Lake Solenoe, Omsk: Rationalizing Marketing and Research ..... 873
<i>Bliadze Vladimir G., Yaryshev Vladislav Yu., Nikolaev Alexander L.</i> Ultrasound Acceleration of Milk Fat Separation ..... 746	<i>Krotova Maria G., Grishaeva Irina N.</i> Collagen Hydrolysed from Maral Raw Material: Production Technology and Biochemical Composition ..... 885
	<i>Osintseva Maria A., Dyukova Evgenia A., Ulyanova Ekaterina G., Osintsev Alexey M.</i> Heavy Metals Accumulation in Plants During Coal Mine Reclamation ..... 898