

## АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (Ph.D.)  
по специальности «6D070100 – Биотехнология»

**Айтжановой Аиды Асылбековны**

на тему: «Разработка новых функциональных напитков на основе  
молочной сыворотки с использованием консорциумов молочнокислых  
бактерий и лактозосбраживающих дрожжей»

**Общая характеристика работы.** В ходе выполнения работы были выделены и отобраны антагонистически активные штаммы микроорганизмов; составлены консорциумы; проверена выживаемость в условиях желудочно-кишечного тракта и стимулирующая нормофлору активность; подтверждена эффективность отобранных консорциумов в культуре кишечных клеток Caco-2 с использованием отобранных микроорганизмов; разработаны напитки на основе молочной сыворотки; начато внедрение напитков в производство.

**Актуальность темы исследования.** Являясь вторичным продуктом молочной промышленности, молочная сыворотка в основном попадает в отходы, несмотря на то, что в ней остается до 50% сухих веществ молока, до 250 различных соединений (азотистые, микро - и макросоединения, молочный жир, минеральные соли, лактоза, витамины, ферменты, органические кислоты), а продукты из нее имеют наряду с питательной ценностью диетическое и лечебное значение. Пищевая ценность вторичного молочного сырья, как и молока, очень высокая, оно характеризуется хорошей усваиваемостью, оптимальным соотношением питательных веществ, биологической и физиологической совместимостью.

Дрожжи *Candida* - это комменсальный микроорганизм и наиболее распространенный грибковый патоген человека во всем мире. Кандидоз стал серьезной клинической проблемой из-за растущего числа людей с ослабленным иммунитетом, которые восприимчивы к инфекции. Смертность от инвазивного кандидоза составляет 46-75%.

Одним из наиболее экологически обоснованных способов контроля патогенных микроорганизмов является использование их естественных антагонистов. Важнейшими антагонистами грибковых микроорганизмов признаны молочнокислые бактерии, оздоровительное действие которых позволяет нормализовать микрофлору желудочно-кишечного тракта человека с одновременным положительным влиянием на состояние его иммунного статуса.

Актуальность темы подтверждается лавиной научных публикаций в области исследования противогрибковых метаболитов молочнокислых бактерий, однако до сих пор не установлен полный характер взаимодействий молочнокислых бактерий и дрожжей рода *Candida*. Более того, не показано подавление роста дрожжевых микроорганизмов при наличии их клеточного контакта с молочнокислыми бактериями. Несмотря на пристальное внимание исследователей к обсуждаемой проблеме практических результатов в виде функциональных продуктов на основе молочнокислых микроорганизмов, способствующих профилактике и лечению кандидомикозов, пока нет. Между

тем, острая необходимость разработки натуральных лечебных и профилактических продуктов, способствующих нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека путем элиминации из него возбудителей кандидомикоза уже назрела. Было показано, что выраженную антагонистическую активность в отношении дрожжей рода *Candida* проявляют только напитки на основе кобыльего и верблюжьего молока, основанные на определенном сочетании молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей, активных в отношении дрожжей рода *Candida* в совместной культуре. Однако, мировая промышленность ориентирована на использование коровьего молока, поэтому необходима разработка функциональных кисломолочных продуктов, подавляющих рост условно-патогенных дрожжей на основе молочной сыворотки.

**Цель работы:** разработка новых функциональных напитков на основе молочной сыворотки с использованием консорциумов молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей.

**Задачи исследования:**

- Выделение и отбор новых штаммов молочнокислых микроорганизмов, антагонистически активных в отношении условно-патогенных дрожжей рода *Candida*, составление консорциумов молочнокислых бактерий и дрожжей с высокой противогрибковой и антибактериальной активностью.

- Молекулярная идентификация отобранных антагонистически активных штаммов.

- Идентификация противогрибковых соединений отобранных микроорганизмов.

- Повышение выживаемости микроорганизмов антагонистически активного консорциума в условиях желудочно-кишечного тракта и стимулирующего индигенную микрофлору воздействия.

- Повышение противогрибковой активности полученных консорциумов введением растительных добавок.

- Разработка технологии нового функционального кисломолочного напитка на основе молочной сыворотки с противогрибковым эффектом.

**Объекты исследования:** молочнокислые, уксуснокислые бактерии и лактозосбраживающие дрожжи и их консорциумы, антагонистически активные в отношении дрожжей рода *Candida*, плесневых грибов и кишечных условно-патогенных бактерий.

**Предмет исследования:** биотехнологически-ценные показатели новых штаммов микроорганизмов, выделенных из казахских национальных напитков, их антагонистическая активность, возможность повышения противогрибковой активности путем обогащения среды добавками растительного происхождения и разработки функциональных столовых и диетически-профилактических напитков на основе молочной сыворотки.

**Методы исследования:** Антагонистическую активность определяли методами отсроченного антагонизма. Идентификацию проводили секвенированием по Сэнгеру генов 16s рРНК бактерий и ITS региона дрожжей. Летучие метаболиты активных ассоциаций анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Для повышения выживаемости в условиях

желудочно-кишечного тракта использовали физическую иммобилизацию на пшеничных отрубях. Защитный эффект отобранных ассоциаций от повреждающего воздействия *Candida albicans* исследовали в культуре клеток кишечного эпителия человека Caco2.

**Научная новизна исследования.** Были выделены новые штаммы микроорганизмов из составлены заквасочные ассоциации с противогрибковой и антибактериальной активностью, включающие молочнокислые, уксуснокислые бактерии и лактозосбраживающие дрожжи. Впервые показана корреляция изобилия уксуснокислых бактерий в образцах кумыса с их анти-*Candida* активностью. Подтверждена эффективность разработанных ассоциаций в культуре клеток Caco-2 кишечного эпителия. Разработаны напитки на основе молочной сыворотки с противогрибковым эффектом.

**Теоретическая значимость исследования:** Результаты исследований показывают, современные представления о метаболизме моно- и смешанных культур молочнокислых бактерий и дрожжей в плане их антагонистической активности. В работе впервые выявлена взаимосвязь противогрибковой анти-*Candida* активности кумыса с наличием значительных количеств уксуснокислых бактерий, обоснована значимость их включения в закваски для получения кисломолочных продуктов.

**Практическая ценность работы.** Использование молочной сыворотки позволит предотвратить сбрасывание ее в сточные воды, повысить рентабельность молокоперерабатывающих предприятий и получить дополнительную прибыль за счет реализации напитка. Употребление напитка понизит частоту кишечных инфекций, повысит уровень здоровья населения и сократит расходы на лекарственные средства, в том числе импортируемые.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Наиболее перспективным источником для выделения антагонистически активных и биотехнологически ценных штаммов молочнокислых и уксуснокислых бактерий является казахский национальный напиток кумыс.

2. В подавлении роста условно-патогенных дрожжей образцами кумыса и ассоциациями молочнокислых микроорганизмов большое значение имеет наличие в них уксуснокислых бактерий.

3. Повышение выживаемости микроорганизмов закваски может быть достигнуто путем физической иммобилизации на пшеничных отрубях.

4. Введением в состав закваски уксуснокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей и введением в среду культивирования пшеничных отрубей может быть достигнуто снижение подавляющего индигенную микрофлору воздействия пробиотических молочнокислых бактерий.

5. Введение различных растительных добавок может способствовать повышению анти-*Candida* антагонизма заквасочных ассоциаций.

6. Разработка технологической схемы функционального столового напитка на основе молочной сыворотки.

#### **Основные результаты исследований и выводы:**

Из молока различных видов животных и кумыса выделены молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии и лактозосбраживающие дрожжи. Показано

подавление роста условно-патогенных дрожжей рода *Candida* рядом образцов казахских национальных напитков кумыс и шубат. По антагонистической активности было отобрано 12 активных изолятов молочнокислых бактерий. По молекулярно-генетической идентификации, штаммы отнесены к видам *Lactobacillus paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. diolivorans*. Определен компонентный состав и проведена идентификация микроорганизмов коллекционной ассоциации KG, антагонистически активной в отношении условно-патогенных дрожжей рода *Candida*. Бактериальные компоненты ассоциации идентифицированы как *L. delbrueckii* 5, *L. gallinarum* 1, *L. parabuchneri* 3, *L. paracasei* 33-4, *A. syzigii* 2. В метагеномном исследовании образцов кумыса в контексте их анти-*Candida* активности показана ее зависимость от количества уксуснокислых бактерий, а также отрицательное влияние на антагонизм избытия молочнокислых кокков (*Lactococcus*, *Streptococcus*).

Составлены ассоциации молочнокислых бактерий, уксуснокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей, подавляющие рост *Candida albicans*. Отобраны наилучшие по антагонизму, органолептическим показателям и кислотообразованию в молочной сыворотке ассоциации: А6, включающая *L. fermentum* А15, *L. paracasei* 4m-2b, *A. fabarum* 4-4М, *K. marxianus* 4МА; KG-3V, состоящая из *L. delbrueckii* 5, *L. gallinarum* 1, *L. parabuchneri* 3, *L. paracasei* 33-4, *A. syzigii* 2 и *K. marxianus* 19.

Идентифицированы противогрибковые соединения наиболее антагонистически активной ассоциации KG-3V. Показано присутствие в культуральной жидкости через 24 ч культивирования уксусной кислоты в количестве  $16,6 \pm 0,64$  мг/мл. Показана связь части анти-*Candida* активности ассоциации KG-3V с клеточной фракцией.

Показано отсутствие токсичности двух ассоциаций, включающих молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии и лактозосбраживающие дрожжи в культуре клеток кишечного эпителия Сасо-2, подтверждена их анти-*Candida* эффективность в культуре клеток Сасо-2.

Выявлен защищающий индигенную микрофлору эффект внесения в состав закваски наряду с молочнокислыми бактериями также лактозосбраживающих дрожжей и уксуснокислых бактерий, а в среду культивирования – пребиотической добавки пшеничных отрубей. Продемонстрировано защитное влияние физической иммобилизации заквасочной ассоциации на пшеничных отрубях на выживаемость составляющих микроорганизмов при кислотном и желчном стрессах. Показана возможность повышения антагонистической активности заквасочных ассоциаций внесением в среду культивирования растительных добавок.

Разработаны рецептуры синбиотических напитков на молочной сыворотке, способствующие подавлению роста условно-патогенных дрожжей *Candida albicans*, плесневых грибов из родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, а также условно-патогенных бактерий из родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, на основе ассоциации А6, включающей *L. paracasei* 4m-2b, *L. fermentum* А15, *K. marxianus* 4МА и *A. fabarium* 4-4М.

Начато внедрение в производство ферментированного напитка на основе молочной сыворотки с использованием консорциума KG-3V *L. delbrueckii* 5, *L. gallinarum* 1, *L. paracasei* 33-4, *L. parabuchneri* 3, *A. syzygii* 2 и *Kl. marxianus* 19.

**Связь с планом основных научных работ.** Диссертация выполнена в рамках проекта № AP05132352 «Разработка новых синбиотических функциональных напитков с противогрибковым и антибактериальным эффектом на основе молочной сыворотки» 2018-2021гг.

**Апробация работы.** Результаты, полученные в диссертационной работе, докладывались и обсуждались на: - VI международная научная конференция молодых ученых и студентов. Перспективы развития биологии, медицины и фармации. «Новые консорциумы молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей, активные в отношении условно патогенных дрожжей рода *Candida*» Южно-Казахстанская медицинская академия. Шымкент, 2018 г.; Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» VI халықаралық ғылыми конференциясы. «*Candida* туысының шартты-патогенді ашытқыларына қатысты саңырауқұлақтарға қарсы белсенділікке ие қымыз микроорганизмдерін бөліп алу» Алматы, 2019 ж.; "Kazakh National Academy of Sciences", Международная конференция «Alternative Approaches to Combatting Anti-Microbial Resistance» (AMR). America, 2019; «Мир Фараби» «Антагонистическая активность ассоциаций молочнокислых бактерий в отношении условно-патогенных дрожжей рода *Candida*» Алматы, 2020 г.; Вестник КазНУ, сер. биологическая. «Выделение штаммов микроорганизмов из казахских кисломолочных продуктов с антагонистической активностью в отношении дрожжей рода *Candida*» Алматы, 2019 г.; Вестник КазНУ, сер. биологическая. «Отбор антагонистически активных штаммов молочнокислых бактерий из молока различных видов животных» Алматы, 2020 г.; Вестник КазНУ, сер. биологическая. «Разработка нового функционального синбиотического кисломолочного напитка на основе молочной сыворотки» Алматы, 2021 г.; Монография «НПЦ микробиологии и вирусологии», Функциональные напитки на молочной сыворотке. Алматы, 2020 г.; AIMS Agriculture and Food. «Impact of probiotics and their metabolites in enhancement the functional properties of whey-based beverages» Америка, 2020; Applied Food Biotechnology. «Immobilization of dairy starter on wheat bran enhance viability under acid and bile stress» Иран, 2020; World Journal of Microbiology and Biotechnology. «Dairy associations for the targeted control of opportunistic *Candida*» Италия, 2021.

**Публикации и личный вклад автора.** Основное содержание диссертации отражено в 15 печатных работах, включая 3 статьи в международных журналах, цитируемых в Scopus, 3 статьи в республиканских научных журналах из перечня ККСОН, 6 тезисов в материалах конференции республиканского и международного уровня.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка использованных источников из 119 наименований, содержит 11 таблиц и 28 рисунков.