ENGINEERING

FOOD METAENGINEERING

Пищевая Метаинженерия

Volume 2 | Issue 2 | 2024

FOOD METAENGINEERING
Научный рецензируемый журнал
No 2 | 2024
Периодичность издания: ежеквартально

Учредитель и издатель:
Федеральное государственное автономное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Главный редактор
Галстян Арам Генрихович — доктор технических наук, академик РАН, профессор РАН, директор Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Заведующий редакцией журнала, академический редактор
Тихонова Елена Викторовна — кандидат исторических наук, доцент, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (Москва, Россия)

Ответственный секретарь
Рябова Анастасия Евгеньевна — кандидат технических наук, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (Москва, Россия)

Редактор по этике
Косычева Марина Александровна — доцент, кандидат филологических наук, доцент, Высшая школа экономики (Москва, Россия)

Рецензируемый научный журнал FOOD METAENGINEERING («ПИЩЕВАЯ МЕТАИНЖЕНЕРИЯ») зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 13 марта 2023 года (Свидетельство о регистрации Эл № ФС77-84878 — сетевое издание).

Адрес учредителя и издателя:
115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7, к. 406
Тел. +7 (499) 236-32-23
E-mail: fme@vnimi.org
Официальный сайт учредителя: vnimi.org
Официальный сайт редакции: fme-journal.org
Распространение: Распространяется бесплатно

© ВНИМИ, 2024
Подписан в печать: 30.06.2024

FOOD METAENGINEERING
Scientific peer-reviewed journal
No 2 | 2024
Publication Frequency: Quarterly

Founder and Publisher:
All-Russian Dairy Research Institute (VNIMI)

Editor-in-Chief
Aram G. Galstyan — Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Engineering, Professor, Director, All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia)

EDITORIAL OFFICE

Head of the Editorial Team, Academic Editor
Elena V. Tikhonova — Cand. Sci. (History), Assistant professor, All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia) (ORCID)

Executive Secretary
Anastasiia Riabova — Cand. Sci. (Engineering), All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia)

Editor by Ethics
Marina A. Kosycheva — Cand. Sci. (Philology), Assistant professor, Higher School of Economics, (Moscow, Russia)

The Journal is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communication, Information Technologies and Mass Media.
The Mass Media Registration Certificate EL No FS77–84878 dated March 13, 2023.

Postal address :
406 room, 35/7, Lyusinovskaya st., Moscow, Russain Federation, 115093
Tel. +7 (499) 236-32-23
E-mail: fme@vnimi.org
Official web site of Founder: vnimi.org
Official web site of the Editorial Office: fme-journal.org
Subscription: Free distribution

© VNIMI, 2024
Signed for printing: 30.06.2024

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

- **Бабич Ольга Олеговна —** доцент, доктор технических наук, директор Научно-образовательного центра «Промышленные биотехнологии», Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (Калининград, Россия)
- **Багиров Вугар Алинияз оглы —** член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, директор Департамента координации деятельности организаций в сфере сельскохозяйственных наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия)
- **Будрик Владислав Глебович** — кандидат технических наук, директор, Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности — филиал Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства РАН (Ржавки, Россия)
- **Донник Ирина Михайловна** — академик РАН, профессор, доктор биологических наук, помощник президента, НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия)
- **Евдокимов Иван Алексеевич** — член-корреспондент РАН, профессор, доктор технических наук, заведующий базовой кафедрой технологии молока и молочных продуктов, Северо-Кавказский федеральный университет (Ставрополь, Россия)
- **Линденбек Марио** — доктор сельскохозяйственных наук, Business consulting Lindenbeck (Берлин, Германия)
- **Лобачевский Яков Петрович** — академик РАН, профессор, доктор технических наук, первый заместитель директора, Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ (Москва, Россия) (ORCID)
- **Мартиросян Владимир Викторович** — профессор РАН, доктор технических наук, заместитель директора по научной работе, Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности (Москва, Россия)
- **Мельникова Елена Ивановна** — профессор, доктор технических наук, профессор кафедры технологии продуктов животного происхождения, Воронежский государственный университет инженерных технологий (Воронеж, Россия)
- **Петров Андрей Николаевич** — академик РАН, доктор технических наук, главный научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (Москва, Россия)
- **Просеков Александр Юрьевич** — член-корреспондент РАН, профессор РАН, профессор, доктор технических наук, доктор биологических наук, ректор, Кемеровский государственный университет (Кемерово, Россия)
- **Семипятный Владислав Константинович** — доктор технических наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (Москва, Россия)
- **Серба Елена Михайловна** — член-корреспондент РАН, профессор РАН, доцент, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии, филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия)
- **Сложенкина Марина Ивановна —** член-корреспондент РАН, профессор РАН, профессор, доктор биологических наук, директор, Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции (Волгоград, Россия)
- **Федотова Ольга Борисовна** — старший научный сотрудник, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательскоий институт молочной промышленности (Москва, Россия)
- **Чернуха Ирина Михайловна** — академик РАН, профессор, доктор технических наук, руководитель отдела координации международных и инициативных проектов, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН (Москва, Россия)

EDITORIAL COUNCIL

- **Olga O. Babich** —
Associate Professor, Doctor of Engineering, Director, the Scientific and Educational Center «Industrial Biotechnologies», Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia)

- **Vugar A. Bagirov** —
Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Doctor of Biological Sciences, Director of the Department for Coordinating the Activities of Organizations in the Field of Agricultural Sciences, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Moscow, Russia)

- **Vladislav G. Budrik** —
Cand. Sci. (Engineering), Director, All-Russian Research Institute of the Poultry Processing Industry, All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Farming of the Russian Academy of Sciences (Rzhavki, Russia)

- **Irina M. Donnik** —
Academician, Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Biological Sciences, presidential aide, National Research Center «Kurchatov Institute» (Moscow, Russia)

- **Ivan A. Evdokimov** —
Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, Head of the Basic Department of Technology of Milk and Dairy Products, North Caucasian Federal University (Stavropol, Russia)

- **Mario Lindenbeck** —
Doctor of Agricultural Sciences, Business Consulting Lindenbeck (Berlin, Germany)

- **Yakov P. Lobachevsky** —
Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, First Deputy Director, the Federal Scientific Agroengineering Center VIM (Moscow, Russia)

- **Vladimir V. Martirosyan** —
Professor of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Engineering, Deputy Director for Research, Scientific Research Institute of the Baking Industry (Moscow, Russia)

- **Elena I. Melnikova** —
Professor, Doctor of Engineering, Professor of the Department of Technology of Animal Origin Products, Voronezh State University of Engineering Technologies (Voronezh, Russia)

- **Andrey N. Petrov** —
Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Engineering, Chief Researcher, All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia)

- **Alexander Yu. Prosekov** —
Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, Doctor of Biological Sciences, Rector, Kemerovo State University (Kemerovo, Russia)

- **Vladislav K. Semipyatny** —
Doctor of Technical Sciences, Senior Researcher, All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia) (ORCID)

- **Elena M. Serba** —
Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Associate Professor, Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for Research, All-Russian Research Institute of Food Biotechnology, Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia)

- **Marina I. Slozhenkina** —
Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Biological Sciences, Director, Volga Research Institute for the Production and Processing of Meat and Dairy Products (Volgograd, Russia) (ORCID)

- **Olga B. Fedotova** —
Senior Researcher, Doctor of Engineering, Leading Researcher / Scientific Secretary, All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia)

- **Irina M. Chernukha** —
Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, Head of the Department for Coordinating International and Initiative Projects, Federal Scientific Center for Food Systems named after V. M. Gorbatov, Russian Academy of Science (Moscow, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ

РЕДАКТОРСКАЯ СТАТЬЯ

А. Е. Рябова
Редакционные политики научного журнала как инструмент развития академической грамотности 7

ОРИГИНАЛЬНОЕ ЭМПИРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

А. Ю. Колоколова, С. А. Кишилова, И. В. Рожкова, В. А. Митрова
Изучение стимулирования роста бифидобактерий постбиотическим комплексом кисломолочного продукта как один из факторов повышения его биологической эффективности 12

О. В. Кригер, Е. И. Шепель
Влияние способа получения экстрактов цветков бархатцев распростертых (Tagetes patula L.) на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность 22

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

О. О. Бабич, О. Б. Калашникова, Е. В. Ульрих, С. А. Сухих
Методы получения и применение янтарной кислоты в пищевой промышленности: обзор предметного поля 35

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров
Использование рекомбинантных белков в современной пищевой биотехнологии: обзор предметного поля 47

CONTENTS

EDITORIAL

Anastasia E. Ryabova
Editorial Policies of a Scientific Journal as a Tool for Developing Academic Literacy 8

ORIGINAL EMPIRICAL RESEARCH

Anastasia Y. Kolokolova, Svetlana A. Kishilova, Irina V. Rozhkova, Vera A. Mitrova
The Role of Postbiotic Composition in the Growth Stimulating of Bifidobacteria 13

Olga V. Kriger, Ekaterina I. Shepel
The Effect of the Preparation Method on the Content of Biologically Active Substances and Antimicrobial Activity of Extracts of Marigold Flowers *(Tagetes patula L.)* 23

REVIEW

Olga O. Babich, Olga B. Kalashnikova, Elena V. Ulrich, Stanislav A. Sukhikh
Methods for Obtaining and Using Succinic Acid in the Food Industry: A Scoping Review 36

Sergey Yu. Filkin, Alexey V. Lipkin, Alexey N. Fedorov
Application of Omics Methods in the Study of Endophytic Microorganisms: A Scoping Review 48

РЕДАКТОРСКАЯ СТАТЬЯ

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.59

Редакционные политики научного журнала как инструмент развития академической грамотности

А. Е. Рябова

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

В редакционной статье прокомментированы политики журнала, определяющие контуры взаимодействия авторов статей с редакцией и формирующие основные акценты в сфере научной коммуникации. Цель статьи - проанализировать влияние политик журналов на структурирование рукописи научной статьи, редакционно-издательский цикл, процесс рецензирования и проведения исследования. Информация, представленная в статье, призвана расширить компетенции авторов журнала в сфере научной коммуникации.

Ключевые слова: редакционные политики; академическая грамотность, научный журнал, научная коммуникация

Корреспонденция:
Рябова Анастасия Евгеньевна
E-mail: a_ryabova@vnimi.org

Конфликт интересов:
автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 13.05.2024
Доработана: 09.06.2024
Принята: 15.06.2024
Опубликована: 30.06.2024

Copyright: © 2024 Автор

Для цитирования: Рябова, А. (2024). Редакционные политики научного журнала как инструмент развития академической грамотности. *FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 7-11. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.59

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.59

Editorial Policies of a Scientific Journal as a Tool for Developing Academic Literacy

Anastasia E. Ryabova

All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

The editorial article comments on the journal's policies that define the contours of interaction between article authors and the editorial board, shaping the main focus in the field of scientific communication. The purpose of the article is to analyze the impact of journal policies on the structuring of a scientific article manuscript, the editorial and publishing cycle, the review process, and the conduct of research. The information presented in the article is intended to enhance the competencies of journal authors in the field of scientific communication.

Keywords: editorial policies, academic literacy, scientific journal, scientific communication

Correspondence:
Anastasia E. Ryabova
E-mail: a_ryabova@vnimi.org

Conflict of interest:
The author reports the absence of a conflict of interest.

Received: 13.05.2024
Revised: 09.06.2024
Accepted: 15.06.2024
Published: 30.06.2024

Copyright: © 2024 The Author

To cite: Ryabova, A. (2024). Editorial policies of a scientific journal as a tool for developing academic literacy. *FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 7-11. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.59

ВВЕДЕНИЕ

Научные исследования играют важнейшую роль в развитии знаний и технологий, а их качество и достоверность зависят от множества факторов, среди которых ключевую роль играют редакционные политики научных журналов. Эти политики формируют основу для оценки, публикации и распространения научных данных, обеспечивая стандарты, которые необходимы для поддержания научной интеграции. Знакомство с редакционными политиками и строгое им следование являются неотъемлемой частью работы каждого исследователя и научного сообщества в целом.

КАЧЕСТВО И ДОСТОВЕРНОСТЬ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Одной из основных задач редакционных политик научных журналов является обеспечение качества и достоверности научных исследований. Этот процесс включает несколько ключевых аспектов, каждый из которых играет важную роль в формировании надежной и точной научной базы.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ

Политика рецензирования каждого научного журнала представляет и описывает для рецензентов и авторов процессы рецензирования. В случае двойного слепого рецензирования и автор, и рецензент остаются анонимными, что помогает избежать предвзятости и позволяет рецензентам объективно оценивать качество исследования без влияния авторитетности автора. Открытое предпубликационной и постпубликационное рецензирование реализуются вне контекста анонимности и сопровождаются публикацией текста рукописи на сайте журнала вместе с текстом статьи.

Рецензенты тщательно проверяют методы исследования, чтобы убедиться в их адекватности и корректности, оценивают данные на предмет их достоверности и репрезентативности, а также анализируют, насколько логичны и обоснованы выводы, сделанные на основе представленных данных. Открытое рецензирование, в котором и автор, и рецензент знают личности друг друга, способствует более открытой и прозрачной коммуникации, что может улучшить качество обратной связи и взаимодействия между участниками процесса. Однако такой подход к рецензированию может привести к предвзятости. Иногда используется рецензирование на основе одного рецензента, что ускоряет процесс, но может снизить глубину анализа, и подходит для журналов с ограниченными ресурсами или для менее значительных публикаций.

Процесс рецензирования предоставляет авторам ценную обратную связь от экспертов в их области. Конструктивная критика помогает ученым увидеть слабые места в своих исследованиях и улучшить их. Это не только повышает качество отдельных статей, но и способствует развитию критического мышления и самоанализа у исследователей, что является важной составляющей академической грамотности.

РЕДАКЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ

Политика в сфере редакционного контроля включает несколько этапов, начиная с первичной оценки редакторами, на которой статьи проходят предварительную оценку на соответствие тематике журнала и общим стандартам качества. Это помогает отсеять откровенно слабые или нерелевантные исследования до стадии рецензирования. После успешного прохождения рецензирования статьи проходят корректуру и форматирование, что включает проверку грамматики, стилистики и соответствия формальным требованиям журнала, улучшая читаемость и восприятие статьи.

Редакционные политики также определяют стандарты качества, такие как требования к оригинальности, где журналы требуют от авторов представления оригинальных исследований, которые не были ранее опубликованы. Это предотвращает дублирование и способствует новизне научных данных. Исследования должны соответствовать этическим нормам, особенно если они включают эксперименты с участием людей или животных, и авторы должны предоставить доказательства соблюдения этих стандартов, что способствует ответственности и профессионализму.

ПОДДЕРЖКА АВТОРОВ

Многие научные журналы предоставляют авторам ресурсы и поддержку для улучшения их научных работ. Это может включать в себя руководство по написанию статей, советы по структуре и оформлению, а также примеры успешных публикаций. Такая поддержка помогает авторам, особенно начинающим исследователям, понять тре-

бования к академическому письму и развивать свои навыки. Это также способствует повышению уровня научной грамотности в целом.

ПРОЗРАЧНОСТЬ И ЭТИКА ПУБЛИКАЦИЙ

Редакционные политики научных журналов в сфере этики комментируют правила, касающиеся этики публикаций, охватывая такие аспекты, как предотвращение плагиата, корректное цитирование источников, и соблюдение авторских прав. Этические стандарты помогают формировать у авторов уважение к исследованиям коллег и оригинальности представляемого контента, что является важным аспектом академической грамотности. Прозрачность в процессах публикации также способствует доверию к научным журналам и их содержимому.

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ И ДОСТУПНОСТЬ

Многие научные журналы стремятся к соответствию международным стандартам, таким как форматирование статей по стилю APA или MLA, требования к метаданным и т.д. Это помогает унифицировать научные публикации и сделать их доступными для международного сообщества. Соблюдение этих стандартов учит авторов следовать общепринятым нормам, что способствует развитию академической грамотности на глобальном уровне.

ПОЛИТИКИ ДОСТУПА К КОНТЕНТУ, ДАННЫМ И ОПИСАНИЕ АВТОРСКОГО ВКЛАДА

Политики доступа регулируют, будут ли статьи открытыми для всех или доступны по подписке, что влияет на распространение и доступность научных знаний. Политики авторства определяют, кто может быть включен в список авторов и как должен определяться порядок авторов, что помогает избежать споров и недоразумений (Косычева, 2023).

Политики данных и репозиториев требуют от авторов предоставлять исходные данные для проверки и повторного анализа, что повышает прозрачность и воспроизводимость исследований. Политики прозрачности и отчетности требуют от авторов предоставлять подробное описание методологии и отчеты о финансировании, что способствует открытости научного процесса. Наконец, политики о типах статей определяют, какие виды исследований будут опубликованы, поддерживая разнообразие научных публикаций и обеспечивая платформу для различных типов исследований.

ПОЛИТИКИ ОТНОСИТЕЛЬНО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА

Политики в отношении использования инструментов искусственного интеллекта (ИИ) направлены на обеспечение прозрачности и достоверности исследований, в которых применяются методы ИИ. Они включают требования к раскрытию информации о том, как использовались алгоритмы ИИ, какие данные были использованы для обучения моделей и каковы были критерии оценки их производительности. Это помогает избежать черных ящиков в исследованиях и способствует более ответственному использованию ИИ.

Редакционные политики, связанные с ИИ, также включают рекомендации по обеспечению этичности и справедливости алгоритмов. Авторы должны демонстрировать, что их модели ИИ не содержат предвзятости и не приводят к дискриминации по каким-либо признакам. Журналы могут требовать предоставления исходного кода и данных, чтобы рецензенты могли воспроизвести результаты и убедиться в корректности выводов. Аналогичные требования предъявляются и к рецензентам (Рябова, 2024). В случае использования ИИ рецензенты обязаны указывать — как. Когда и с какой целью использовался ИИ, и какие именно инструменты ИИ использовались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Редакционные политики научных журналов формируют стандарты научной коммуникации, делая ее более структурированной и качественной. Это приводит к повышению доверия к журналам с высоким уровнем редакционных политик, распространению точных и полезных знаний в научном сообществе, а также к формированию надежной научной базы, на которой можно строить дальнейшие исследования и открытия. Крайне важным является ознакомление с редакционными политиками и жесткое им следование как со стороны авторов, так и со стороны всех участников редакционно-издательского цикла. Такой подход не только сократит время реализации редакционно-издательского цикла, но и сократит объем переписки между авторами и редакцией.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Косычева, М.А. (2023). Система CRediT для описания авторского вклада. *Health, Food & Biotechnology, 5*(1)б 6–9. https://doi.org/10.36107/hfb.2023.i5.s169

Kosycheva, M.A. (2023). CRediT statement for recognizing author contributions. *Health, Food & Biotechnology, 5*(1), 6–9. https://doi.org/10.36107/hfb.2023.i5.s169

Рябова, А. Е. (2024). Использование искусственного интеллекта при написании научных статей. *Food Metaengineering*, *2*(1), 7–10. https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.51

Ryabova, A.E. (2024). The Application of Artificial Intelligence in Scientific Papers Writing *Food Metaengineering*, *2*(1), 7–10. https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.51

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.56

Изучение стимулирования роста бифидобактерий постбиотическим комплексом кисломолочного продукта как один из факторов повышения его биологической эффективности

А. Ю. Колоколова, С. А. Кишилова, И. В. Рожкова, В. А. Митрова

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Пробиотические микроорганизмы повышают биологическую ценность пищевых продуктов, снижают уровень холестерина, положительно влияют на иммунную систему, предотвращают кишечные инфекции и диарею, связанную с антибиотиками, уменьшают симптомы непереносимости лактозы и др. Эти положительные эффекты зависят от свойств пробиотического штамма. Продукты метаболизма пробиотических микроорганизмов также способны оказывать положительное воздействие на организм человека. Метаболитные комплексы, секретируемые пробиотическими бактериями характеризуются высокой усвояемостью и устойчивостью к условиям окружающей среды и потенциально могут использоваться наряду с пробиотическими микроорганизмами.

Цель: Изучение возможного влияния различных концентраций постбиотической композиции на усиление биологических свойств продукта, в частности, его способности стимулировать рост бифидобактерий.

Материалы и методы: В качестве объектов исследования использовали кисломолочный продукт, на основе пробиотической ассоциации в составе *Lactococcus cremoris* 241Ц, *Lactocaseibacillus rhamnosus F, Propionibacterium shermanii* Э2, выработанный с применением постбиотического комплекса (ПК) в концентрациях 0,5 и 0,01%. При исследовании способности стимулировать рост бифидобактерий в качестве контрольной культуры использовали штамм *Bifidobacterium adolescentis* МС–42 из коллекции ФГАНУ «ВНИМИ». Исследования проводили на среде ГМК 2 и пробиотическом кисломолочном продукте, выработанном на стерильном обезжиренном молоке. Было изучено влияние двух концентраций ПК (0,5 и 0,01%), стимулировать рост бифидобактерий в экспериментальных образцах через 8 и 24 часа инкубирования.

Результаты: Подтверждено положительное влияние постбиотической композиции (ПК) в концентрации 0,01% на рост бифидобактерий. Отсутствие стимулирующего действия ПК в концентрации 0,5% может быть связано с ингибированием уксусной кислотой - конечным продуктом метаболизма бифидобактерий, которая также входит в состав ПК. Об этом также косвенно свидетельствует и более низкое значение активной кислотности, которая, как известно, является значимым фактором для роста бифидобактерий.

Выводы: Полученные данные позволяют подтвердить увеличение биологической эффективности кисломолочного продукта с постбиотическим комплексом применительно к стимулированию роста бифидобактерий, и рекомендовать его в качестве добавки в биотехнологическую систему в концентрации 0,01%.

Ключевые слова: пробиотик, постбиотический комплекс, ассоциация микроорганизмов, стимулирование роста бифидобактерий, кисломолочный продукт.

Корреспонденция:
Колоколова Анастасия Юрьевна
E-mail: a_kolokolova@vnimi.org

Конфликт интересов: авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 09.01.2024
Доработана: 30.05.2024
Принята: 15.06.2024
Опубликована: 30.06.2024

Copyright: © 2024 Авторы

Для цитирования: Колоколова, А.Ю., Кишилова, С.А., Рожкова, И.В., & Митрова, В.А. (2024). Изучение стимулирования роста бифидобактерий постбиотическим комплексом кисломолочного продукта как один из факторов повышения его биологической эффективности. *FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 12-21. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.56

ORIGINAL EMPIRICAL RESEARCH

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.56

The Role of Postbiotic Composition in the Growth Stimulating of Bifidobacteria

Anastasia Y. Kolokolova, Svetlana A. Kishilova, Irina V. Rozhkova, Vera A. Mitrova

All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Probiotic microorganisms are known to increase the biological value of foods, reduce cholesterol levels, positively affect the immune system, prevent intestinal infections and diarrhea associated with antibiotics, reduce symptoms of lactose intolerance, etc. These positive effects depend on the properties of the probiotic strain. The metabolic products of probiotic microorganisms are also capable of having a positive effect on the human body. The metabolic complexes secreted by probiotic bacteria are characterized by high digestibility and resistance to environmental conditions and can potentially be used along with probiotic microorganisms.

Purpose: To study. the possible effect of different concentrations of the postbiotic composition on enhancing the biological properties of the product, in particular, its ability to stimulate the growth of bifidobacteria.

Materials and Methods: As objects of research, a fermented milk product based on a probiotic association consisting of *Lactococcus cremoris* 241C, *Lactocaseibacillus rhamnosus F, Propionibacterium shermanii* E2, developed using a postbiotic complex (PC) in concentrations of 0.5 and 0.01%, was used. In the study of the ability to stimulate the growth of bifidobacteria, a strain of *Bifidobacterium adolescentis* MS–42 from the collection of FGANU «VNIMI» was used as a control culture. The studies were carried out on the GMC 2 medium and a probiotic fermented milk product developed on sterile skimmed milk. The effect of two PC concentrations (0.5 and 0.01%) on stimulating the growth of bifidobacteria in experimental samples after 8 and 24 hours of incubation was studied.

Results: The positive effect of PC at a concentration of 0.01% on the growth of bifidobacteria was confirmed. The absence of a stimulating effect of PC in a concentration of 0.5% may be due to inhibition by acetic acid - the final product

Conclusion: The data obtained allow us to confirm the increase in the biological effectiveness of a fermented milk product with a postbiotic complex in relation to stimulating the growth of bifidobacteria, and recommend it as an additive to the biotechnological system at a concentration of 0.01%.

Keywords: probiotic, postbiotic complex, association of microorganisms, stimulation of growth of bifidobacteria, fermented milk product

Correspondence:
Kolokolova Anastasia
E-mail: a_kolokolova@vnimi.org

Conflict of interest:
The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 09.01.2024
Revised: 30.05.2024
Accepted: 15.06.2024
Published: 30.06.2024

Copyright: © 2024 The Authors

To cite: Kolokolova, A.Yu., Kishilova, S.A., Rozhkova, I.V., & Mitrova, V.A. (2024). The role of postbiotic composition in the growth stimulating of bifidobacteria. *FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 12-21. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.56

ВВЕДЕНИЕ

Использование пробиотических бактерий в рационе питания может привести к положительному изменению состава кишечной микробиоты, укреплению здоровья человека и облегчению или предотвращению некоторых заболеваний (дисбактериоз, колит, диспепсия, аллергия, синдром раздраженного кишечника и др.) (Хавкин, 2021; Islam, 2016; Gareau, 2010; Oelschlaeger, 2010; Martín, 2019). Продукты метаболизма пробиотических культур также могут положительно влиять на здоровье потребителя, корректируя и улучшая секреторную и ферментативную активность пищеварительного тракта нормализуя биохимические и поведенческие и другие физиологические функции. (Saulnier, 2011; Зобкова, 2023; Агаркова, 2016; Compare, 2017).

К основным метаболитам пробиотических и молочнокислых бактерий, образуемым в процессе культивирования, относятся органические кислоты, в том числе короткоцепочечные жирные кислоты, экзополисахариды, витамины, аминокислоты, ферменты, бактериоцины и др. Причем штаммы одного вида микроорганизмов продуцируют различные метаболиты, синтез которых проходит разными путями, и их использование как компонентов функционального питания и нутрицевтиков может быть полезно для предотвращения рисков, связанных с потреблением живых микроорганизмов у пациентов с иммунными нарушениями и заболеваниями поджелудочной железы (Mayorgas, 2021; Aguilar-Toalá, 2018; Кайбышева; 2019).

К преимуществам постбиотической композиции (ПК) по сравнению с живыми клетками можно отнести, помимо безопасности при употреблении, наличие четкой химической структуры, более длительные сроки хранения, возможность точного дозирования ПК, сохранение ее свойств при прохождении через верхние отделы желудочно-кишечного тракта, отсутствие воздействия желудочных кислот и солей на доставку достаточного количества жизнеспособных клеток (Чистяков, 2023). Действие ПК начинается непосредственно после ее приема, минуя традиционную трилогию живых пробиотиков (Szydłowska, 2022; Salminen, 2021). Исследования функциональных свойств постбиотических композиций и сферы их применений постепенно расширяются (Teame, 2020). Имеются клинические данные об использовании ПК для профилактики и лечения заболеваний (Cuevas-González, 2020; Nataraj, 2020; Шендеров, 2017). По мере продолжения исследований будут появляться более масштабные, более точные данные испытаний, подтверждающие эффективность ПК (Бегунова, 2022; Malagón-Rojas, 2020).

Ряд исследователей считают, что метаболитные или постбиотические комплексы (ПК), выработанные путем культивирования пробиотических штаммов, могут использоваться совместно с жизнеспособными клетками заквасочных ассоциаций для производства готовой продукции для людей с дисбиотическими расстройствами ЖКТ. Авторы предполагают, что применение ПК с живыми пробиотическими культурами может усиливать биологическую эффективность продукта, расширяя диапазон его воздействия (Barros, 2020; Олескин, Шендеров, 2020).

ПК можно использовать во многих отраслях промышленности, таких как производство продуктов питания, напитков, медицинских товаров, косметики, нутрицевтиков и т.д (Донская, 2020; Tomar, 2015; Aggarwal, 2022). Во всем мире наблюдается повышение интереса людей к здоровому питанию, способствующему поддержанию физического и психического здоровью человека, помимо питательной ценности (Шендеров, 2017). Исследуются возможности использования постбиотических композиций как компонентов функционального питания и нутрицевтиков (Чистяков, 2023). Исследователи выявляют конкретные компоненты постбиотических препаратов, которые играют решающую роль в оказании воздействия, влияющего на здоровье. Одним из первых описанных постбиотических соединений с мощной антипатогенной активностью был реутерин, производимый *L. reuteri*, который подавляет рост многих кишечных патогенов, включая сальмонеллу, шигеллу, протей, синегнойную палочку, стафилококк, грибы и простейшие, играя важную роль в поддержании здорового кишечного микробиома, и поддерживая оптимальную проницаемость кишечника (Ali, 2022). Наиболее распространенными на сегодняшний день продуцентами постбиотических композиций являются представители *Bifidobacterium sps*, и *Lactobacillus*. Проводятся исследования возможностей применения постбиотиков в младенческом возрасте, когда происходит формирование кишечного барьера и иммунитета (Комарова, 2023; Giorgetti, 2015).

В 2023 году был исследован состав и пробиотический потенциал комплекса метаболитов, продуцируемых *L. helveticus* H9 (Бегунова, 2022). Подтверждено,

что ПК обладает антимикробной, антиоксидантной и бифидогенной активностью (Rozhkova, 2023). В ходе предварительных исследований была разработана ассоциация микроорганизмов, обладающая пробиотическими свойствами и состоящая из — *Lc. cremoris* 241Ц, *L. rhamnosus F, P shermanii* Э. (Рожкова, 2021). Опираясь на исследование Шендерова (2017), мы предположили, что добавление ПК при выработке пробиотического продукта на основе ассоциации усилит его биологическую эффективность, в частности, его способность стимулировать рост бифидобактерий. Была проведена органолептическая оценка кисломолочного продукта, выработанного с добавлением различных концентраций ПК. Установлено, что концентрации ПК 0,01 % и 0,5 % обеспечивали наиболее высокую сенсорную оценку образцов (Колоколова, 2024). Однако, влияние различных концентраций ПК на биологическую эффективность продукта, разработанного на основе данной ассоциации, в частности, на его способность стимулировать рост бифидобактерий, не было изучено.

Целью данного исследования являлось изучение *in vitro* возможного влияния выбранных концентраций 0,01 % и 0,5 %. постбиотической композиции на способность стимулировать рост бифидобактерий в среде ГМК 2 и в кисломолочном пробиотическим продукте.

Исследовательские вопросы:

(1) изучение возможного стимулирования роста бифидобактерий на среде ГМК 2 при добавлении ПК в концентрациях 0,5 % и 0,01 %.

(2) изучение возможного стимулирования роста бифидобактерий в кисломолочном продукте на основе пробиотической ассоциации при добавлении ПК в указанных концентрациях.

(3) определение концентрации ПК, обеспечивающей повышение биологической эффективности продукта по показателю стимулирования роста бифидобактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Кисломолочный продукт, на основе пробиотической ассоциации в составе *Lactococcus cremoris* 241Ц, *Lactocaseibacillus rhamnosus F*, *Propionibacterium shermanii* Э2, выработанный с применением постбиотического комплекса (ПК) в концентрациях 0,5 и 0,01 %. Контрольной культурой являлся штамм *Bifidobacterium adolescentis* МС–42 из коллекции ФГАНУ «ВНИМИ».

Методы

Учет количества бифидобактерий проводили согласно ГОСТ 33924–2016. Из всех экспериментальных и контрольных образцов готовили ряд последовательных десятикратных разведений, из которых проводили посев в трех повторностях. Посевы выдерживали в термостате при температуре 37 °С. Первичный подсчет бифидобактерий проводили через 24 часа; окончательный — через 72 часа инкубации.

Процедура исследования

Подготовка культур

Активация культур *L. rhamnosus F* и *Lc. cremoris* 241Ц проводилась на стерильном обезжиренном молоке «Стандарт», (Комлимилк, Беларусь); *P. schermanii* Э2 — на питательной среде ГМК 2 («Биокомпас С», Россия).

В качестве контрольной культуры использовали штамм *Bifidobacterium adolescentis* МС–42 из коллекции ФГАНУ «ВНИМИ», активированный на питательной среде ГМК 2 («Биокомпас С», Россия).

Получение ПК

Для получения ПК инокулят *L. helveticus* Н9 в количестве 3 % вносили в питательную среду MRS-бульон (ООО НПЦ «Биокомпас-С», Россия) и инкубировали при температуре (37 ± 1) ºС. Для получения бесклеточного супернатанта накопленную биомассу клеток отделяли центрифугированием при температуре 4 °С в течение 15 мин при 6000 об/мин на центрифуге (Rotanta 46, Германия). Полученный супернатант пропускали через фильтр 0,2 мкм (Sartorius, Германия). Разливали в профламбированные лотки, замораживали и высушивали на лиофильной сушилке (Labconco, США) Концентрации ПК 0,5 % и 0,01 % получали путем разведения в стерильной воде определенной навески ПК, отобранной в асептических условиях.

Подготовка экспериментальных образцов

При выработке кисломолочного продукта в стерильное обезжиренное молоко «Стандарт», (Комлимилк, Бела-

русь); вносили микроорганизмы ассоциации в пропорции 1 : 1 : 6. Одновременно с ассоциацией вносили ПК в изучаемых концентрациях. Культивирование проводили при температуре 37 °С в течение 8 и 24 часов. Образец без внесения ПК являлся контрольным.

Изучение способности постбиотической композиции стимулировать рост бифидобактерий на питательной среде ГМК 2

На первом этапе в качестве экспериментальных образцов использовали среду ГМК-2 (ООО НПЦ «Биокомпас — С», Россия) инокулированную 3 % 16-ти часовой культурой *B. adolescentis* МС-42 с добавлением 0,01 % и 0,5 % ПК. Образец без добавления ПК являлся контрольным. Полученные образцы инкубировали при температуре 37 °С. Оценку влияния постбиотической композиции на рост бифидобактерий проводили через 8 часов и 24 часа инкубации.

Изучение способности постбиотической композиции стимулировать рост бифидобактерий в экспериментальных образцах

На втором этапе в стерильное обезжиренное молоко вносили 5 % подготовленной ассоциации молочнокислых микроорганизмов, 3 % 16-ти часовой культуры *B. adolescentis* МС-42 и ПК в аналогичных первому этапу концентрациях. В качестве контроля использовали кисломолочный продукт без добавления ПК. Полученные образцы инкубировали при температуре 37 °С. Оценку влияния постбиотической композиции на рост бифидобактерий проводили через 8 часов и 24 часа инкубации.

Анализ данных

Все результаты представлены по данным трех независимых экспериментов. Построение таблиц и графиков проводилось с использованием программ Microsoft Office. Результаты исследования обработаны с применением программы Statistica 10, MS Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ

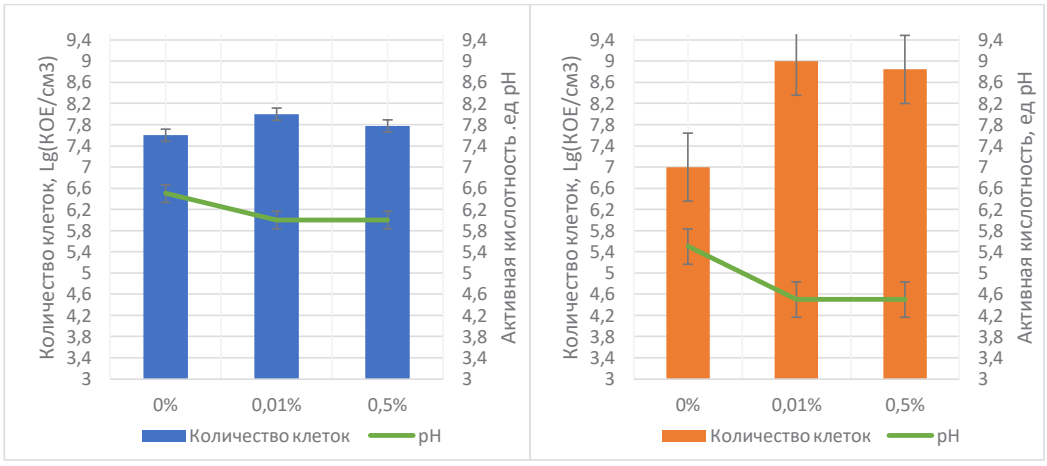
Способность постбиотической композиции стимулировать рост бифидобактерий на питательной среде ГМК 2

Нами была изучена способность ПК в двух концентрациях 0,5 и 0,01 %, стимулировать рост бифидобактерий на питательной среде ГМК 2 через 8 и 24 часа инкубирования (Рисунке 1).

Через 8 часов инкубирования отмечено некоторое увеличение количества клеток бифидобактерии в образце с добавлением 0,01 % ПК (1,0•10^8 КОЕ/см^3) по сравнению с контролем (4,0•10^7 КОЕ/см^3). Добавление 0,5 % ПК стимулирующего действия практически не оказало

Рисунок 1

Изменение роста бифидобактерий в модельных образцах с ПК, внесенным в разных концентрациях



8 часов 24 часа

(6,0•10^7 КОЕ/см^3). Через 24 часа инкубирования стимулирующее влияние ПК на рост бифидобактерий было более выраженным. Количество клеток для концентрации 0,5 % составило 5,7•10^8 КОЕ/см^3 и 1,0•10^9 КОЕ/см^3 для концентрации 0,01 %, по сравнению 7,0•10^7 КОЕ/см^3 в контроле.

Активная кислотность через 8 часов составила в контрольном образце 6.5 ед pH, а в образцах с добавлением ПК несколько ниже — 6,0 ед pH. Через 24 часа культивирования pH в контроле составило 5,5 ед pH, а в экспериментальных образцах 4,5 ед pH; причем не наблюдалось разницы между образцами с различной концентрацией ПК.

Способность постбиотической композиции стимулировать рост бифидобактерий в экспериментальных образцах

Результаты исследований роста бифидобактерий в экспериментальных образцах на основе пробиотической ассоциации и ПК, внесенном в разных концентрациях представлены на Рисунке 2.

Через 8 часов культивирования количество клеток бифидобактерий в образцах на основе пробиотической ассоциации без ПК и с внесением ПК в концентрациях 0,01 % и 0,5 % практически не отличалось и варьировалось в пределах 1,0•10^8 КОЕ/см^3. Через 24 часа культивирования наблюдалось увеличение количества клеток бифидобактерий в образце содержащем ПК в концентрации 0,01 % до 1,0•10^9 КОЕ/см^3, в контрольном образце и в образце содержащем ПК в концентрации 0,5 % составило 2,0•10^8 КОЕ/см^3 и 4,9•10^8 КОЕ/см^3, соответственно.

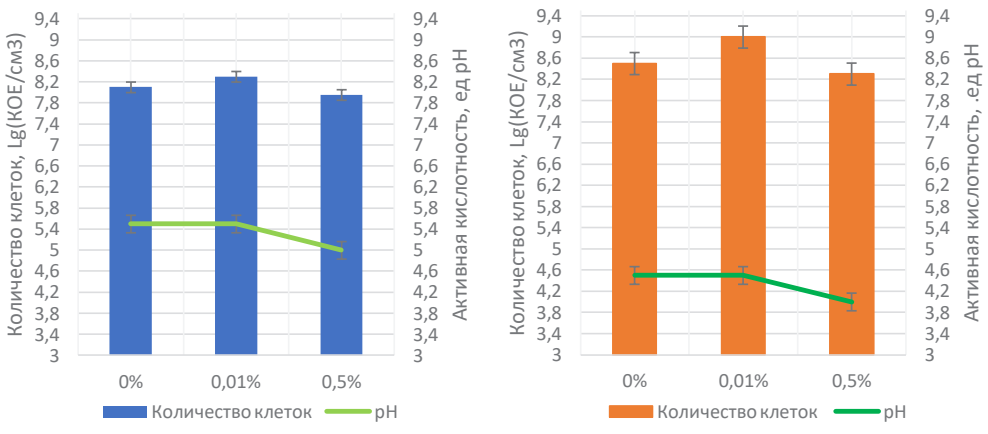
Активная кислотность в образцах через 8 часов в контроле и при добавлении ПК в концентрации 0,01 % составила 5.5 ед pH, а в образце с добавлением ПК в концентрации 0,5 % — 5,0 ед pH. Через 24 часа культивирования pH в контроле составило 4,0 ед pH, а в экспериментальных образцах — 4,5 ед pH; причем не наблюдалось разницы между образцами с различной концентрацией ПК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из значимых пробиотических свойств ПК, является способность стимулировать рост бифидобактерий. Литературные данные, касающиеся влияния на стимулирование роста бифидобактерий ПК, добавляемых в продукт при его выработке, практически отсутствуют. Общепризнанным стимулирующим действием на развитие бифидобактерий обладает олигосахарид с высоким пребиотическим действием — лактулоза (Рябцева, 2023). Ряд авторов указывают на стимулирующую роль пектинов — растительных полисахаридов, содержа-

Рисунок 2

Изменение роста бифидобактерий в экспериментальных образцах на основе пробиотической ассоциации и ПК, внесенном в разных концентрациях



8 часов 24 часа

щихся в том числе в яблоках, для роста бифидобактерий и рекомендуют получение бифидогенных соединений из сырья, содержащего пектины. Так кислые олигосахариды, полученные при гидролизе пектина увеличивали количество бифидобактерий в ЖКТ младенцев, находящихся на искусственном вскармливании. Наличие пектина в соевом молоке также стимулировало рост бифидобактерий (Валышев, 2012). Есть работы, указывающие на стимулирование роста бифидобактерий при совместном культивировании с другими микроорганизмами (уксуснокислыми и пропионовокислыми бактериями), за счет производства дополнительных ростовых факторов (Разгуляева, 2016). Ранее проведенные исследования ПК и ассоциации пробиотических микроорганизмов (Бегунова, 2023; Рожкова, 2021), показали их способность по отдельности стимулировать рост бифидобактерий. На основании этих данных сформулировано предположение о возможном увеличении биологической эффективности кисломолочного продукта на основе ассоциации пробиотических бактерий и ПК в выбранной концентрации за счет стимулирования роста бифидобактерий.

В результате проведенных исследований подтвердилось ожидаемое стимулирование роста бифидобактерий при добавлении ПК 0,01 %, как на питательной среде ГМК 2, так и в кисломолочном пробиотическом продукте. При этом, количество бифидобактерий увеличилось на один порядок по сравнению с контролем. Более выраженное действие ПК в концентрации 0,01 % на рост бифидобактерий через 24 по сравнению с 8 часами, возможно, связано со скоростью роста бифидобактерий, которые, как известно, обладают медленным темпом развития.

Стимулирования роста бифидобактерий в исследуемых образцах с добавлением ПК в концентрации 0,5 % обнаружено не было. Отсутствие стимулирующего действия ПК в существенно более высокой концентрации на развитие бифидобактерий может быть связано с ингибированием их роста конечными продуктами метаболизма — уксусной и молочной кислотами. Эти кислоты также входят в состав ПК. Об этом также косвенно свидетельствует и более низкое значение активной кислотности в образце с 0,5 % ПК, которая, как известно, является значимым фактором для развития бифидобактерий (Бегунова, 2023).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность к стимулированию роста бифидобактерий является одним из важных свойств, повышающих пробиотическую ценность продукта. Полученные нами данные позволяют подтвердить увеличение биологической эффективности кисломолочного продукта с постбиотическим комплексом применительно к стимулированию роста бифидобактерий. Подтверждена эффективность концентрации 0,01 %, подобранной в результате органолептической оценки. Применение ПК (0,01 %) в кисломолочном пробиотическим продукте способствует стимулированию роста бифидобактерий, что является одним из критериев увеличения биологической эффективности готовой продукции. Полученные результаты предполагаются использовать к разработке биотехнологии пробиотического продукта с добавлением ПК.

В целом, спектр микроорганизмов, потенциально перспективных применительно к получению ПК, обладающих ценными свойствами, может быть значительно расширен. Область возможного применения ПК не ограничена пищевой промышленностью, и может использоваться в косметологии, нутрицевтике, фармацевтике, сельском хозяйстве. Дальнейшие исследования по теме предполагают более подробное изучение биологической эффективности ПК, добавляемого при выработке кисломолочного продукта, в частности, его антимикробной, антиоксидантной и АПФ активности.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Колоколова Анастасия Юрьевна: подготовка и создание рукописи.

Кишилова Светлана Анатольевна: проведение экспериментов, подготовка и создание черновика рукописи.

Рожкова Ирина Владимировна: формулирование идеи, исследовательских целей и задач, подготовка и создание рукописи.

Митрова Вера Анатольевна: проведение исследовательского процесса, в частности, проведение экспериментов или сбор данных/доказательств, визуализация/представление данных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Агаркова, Е.Ю., Кручинин, А.Г., & Рязанцева, К.А. (2016). *Современные технологические подходы к обогащению молочных продуктов. Инновационные технологии обогащения молочной продукции (теория и практика)*. Москва: Франтера.

Agarkova, E.Yu., Kruchinin, A.G., & Ryazantseva, K.A. (2016). *Modern technological approaches to the enrichment of dairy products. Innovative technologies for dairy product enrichment (Theory and practice)*. Moscow: Fratera. (In Russ.)

Бегунова, А.В. (2022). Биологически активные метаболиты молочнокислых бактерий. *Пищевая промышленность*, (6), 21–25. https://doi.org/10.37442/fme.2023.3.28

Begunova, A.V. (2022). Biologically active metabolites of lactic acid bacteria. *Food Industry,* (6), 21–25. (In Russ.) https://doi.org/10.37442/fme.2023.3.28

Бегунова, А.В., & Жижин, Н.А. (2022). Оценка потенциала пропионовокислых бактерий для получения постбиотиков. *Хранение и переработка сельхозсырья,* (4), 105–112. https://doi.org/10.36107/spfp.2022.356

Begunova, A.V., & Zhizhin, N.A. (2022). Assessment of the potential of propionic acid bacteria for obtaining postbiotics. *Storage and Processing of Farm Products,* (4), 105–112. (In Russ.) https://doi.org/10.36107/spfp.2022.356

Бегунова, А.В., & Жижин, Н.А. (2023). Характеристика метаболитного комплекса, продуцируемого L. reuteri LR1. *Food Metaengineering*, *1*(3), 11–20. https://doi.org/10.37442/fme.2023.3.28

Begunova, A.V., & Zhizhin, N.A. (2023). Characterization of the metabolite complex produced by L. reuteri LR1. *Food Metaengineering, 1*(3), 11–20. (In Russ.) https://doi.org/10.37442/fme.2023.3.28

Валышев, А. В., & Головченко, В. В. (2012). Пребиотическая активность пектинов и их производных. *Бюллетень Оренбургского научного центра УРО РАН*, (3), 5.

Valyshev, A. V., & Golovchenko, V. V. (2012). Prebiotic activity of pectins and their derivatives. *Bulletin of the Orenburg Scientific Center URO RAS*, (3), 5. (In Russ.)

Зобкова, З.С., Кондратенко, В.В., Пряничникова, Н.С., Зенина, Д.В., & Коровина, Н.С. (2023). Разработка и адаптация прогностической модели полнофакторной оптимизации технологического процесса производства пробиотического кисломолочного продукта. *Food Metaengineering, 1*(4), 48–56. https://doi.org/10.37442/fme.2023.4.30

Zobkova, Z.S., Kondratenko, V.V., Pryanichnikova, N.S., Zenina, D.V., & Korovina, N.S. (2023). Development and adaptation of a predictive model for full-factor optimization of the technological process of probiotic fermented milk product production. *Food Metaengineering, 1*(4), 48–56. (In Russ.) https://doi.org/10.37442/fme.2023.4.30

Комарова, О. Н., & Данилова А. И. (2023). Ферментация молочной основы с естественным образованием олигосахаридов грудного молока — новые возможности в адаптации детских смесей. *Лечащий Врач, 9*(26), 50–56. https://doi.org/10.51793/OS.2023.26.9.006

Komarova, O. N., & Danilova, A. I. (2023). Fermentation of milk base with natural formation of human milk oligosaccharides — new opportunities in the adaptation of infant formulas. *Lechashchiy Vrach, 9*(26), 50–56. (In Russ.) https://doi.org/10.51793/OS.2023.26.9.006

Олескин, А. В., & Шендеров, Б. А. (2020). Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы. *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация, 2*(3), 233–243. https://doi.org/10.36425/rehab25811

Oleskin, A. V., & Shenderov, B. A. (2020). Probiotics, psychobiotics, and metabiotics: Problems and prospects. *Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation, 2*(3), 233–243. (In Russ.) https://doi.org/10.36425/rehab25811

Кайбышева, В. О., & Никонов, Е. Л. (2019). Пробиотики с позиции доказательной медицины. *Доказательная гастроэнтерология, 8*(3), 45–54. https://doi.org/10.17116/dokgastro2019803145

Kaibysheva, V. O., & Nikonov, E. L. (2019). Probiotics from the perspective of evidence-based medicine. *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterologyy, 8*(3), 45–54. (In Russ.) https://doi.org/10.17116/dokgastro2019803145

Рожкова, И. В., Бегунова, А. В., & Крысанова, Ю. И. (2021). Создание кисломолочного продукта с использованием ассоциации пробиотических культур. *Пищевая промышленность*, *8*, 36–39.

Rozhkova, I. V., Begunova, A. V., & Krysanova, Yu. I. (2021). Creation of a fermented milk product using an association of probiotic cultures. *Food Industry*, *8*, 36–39. (In Russ.)

Хавкин, А. В., & Ковтун, Т. А. (2021). Кисломолочные пробиотические продукты — пища или лекарство? *Вопросы детской диетологии*, *19*(3), 58–69. https://doi.org/10.20953/1727-5784-2021-3-58-68

Khavkin, A. V., & Kovtun, T. A. (2021). Fermented probiotic products — food or medicine? *Voprosy Detskoy Dietologii (Pediatric Dietology), 19*(3), 58–69. (In Russ.) https://doi.org/10.20953/1727-5784-2021-3-58-68

Чистяков, В. А., Празднова, Е. В., Денисенко, Ю. В., Стаценко, В. Н., Матросова, С. В., & Кучко, Т. Ю. (2023). Постбиотики: новая группа биопрепаратов. *Живые и биокосные системы,* (45), 1–24. https://doi.org/10.18522/2308–9709-2023–46-1

Chistyakov, V. A., Prazdnova, E. V., Denisenko, Yu. V., Statsenko, V. N., Matrosova, S. V., & Kuchko, T. Yu. (2023). Postbiotics: a new group of biopreparations. *Live and Bio-Abiotic Systems,* (45), 1–24. (In Russ.) https://doi.org/10.18522/2308-9709-2023-46-1

Рябцева, С. А., Храмцов, А. Г., Шпак, М. А., Лодыгин, А. Д., Анисимов, Г. С., Сазанова, С. Н., & Табакова, Ю. А. (2023). Биотехнология производства лактулозы: прогресс, проблемы, перспективы. *Техника и технология производные пищевых продуктов, 53*(1), 97–122. https://doi.org/10.24411/0042-8833-20-10012

Ryabtseva, S. A., Khramtsov, A. G., Shpak, M. A., Lodygin, A. D., Anisimov, G. S., Sazanova, S. N., & Tabakova, Yu. A. (2023). Biotechnology of lactulose production: Progress, problems, prospects. *Food Processing: Techniques and Technology, 53*(1), 97–122. (In Russ.) https://doi.org/10.24411/0042-8833-20-10012

Разгуляева, О. И., & Мезенова, О. Я. (2016). Роль бифидобактерий в кисломолочных продуктах геродиетического назначения. *Вестник молодежной науки*, *4*(6), 6.

Razgulyaeva, O. I., & Mezenova, O. Ya. (2016). The role of bifidobacteria in fermented milk products for gerodietic purposes. *Bulletin of Youth Science, 4*(6), 6. (In Russ.)

Шендеров, Б. А. (2017). Метабиотики — новая технология профилактики заболеваний, связанных с микроэкологическим дисбалансом человека. *Вестник восстановительной медицины, 16*(4), 40–49.

Shenderov, B. A. (2017). Metabiotics — A new technology for the prevention of diseases associated with the microecological imbalance of a person. *Bulletin of Rehablitation Medicine*, *16*(4), 40. (In Russ.)

Abd El-Ghany, W.A. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: Contemporary and promising natural antibiotics alternatives and their applications in the poultry field. *Open Veterinary Journal*, *10*(3), 323–330. https://doi.org/10.4314/ovj.v10i3.11.

Aggarwal, S., Sabharwal, V., Kaushik, P., Joshi, A., Aayushi, A., & Suri, M. (2022). Postbiotics: from emerging concept to application. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *6*. https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.887642

Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Valera, R., Garcia, H., & Mata-Haro, V. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, *75,* 105–114. http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.202000188

Ali, M.A., Kamal, M.M., Rahman, M.H., Siddiqui, M.N., Haque, M.A., Saha, K.K., & Rahman, M.A. (2022). Functional dairy products as a source of bioactive peptides and probiotics: Current trends and future prospectives. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(4), 1263–1279. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05091-8

Compare, D., Rocco, A., Coccoli, P., Angrisani, D., Sgamato, C., & Iovine, B. (2017). Lactobacillus casei DG and its postbiotic reduce the infammatory mucosal response: An ex-vivo organ culture model of post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterology, 17*(1), 53. http://dx.doi.org/10.1186/s12876-017-0605-x

Cuevas-González, P.F., Liceaga, A.M., &Aguilar-Toalá, J.E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, *136*, 109502. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502

Gareau M. G., Sherman P. M., & Walker W. A. (2010). Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 7*(9), 503–514. http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117

Giorgetti, G., Brandimarte, G., Fabiocchi, F., Ricci, S., Flamini, P., Sandri, G., Trotta, M.C., Elisei, W., Penna S., & Islam, S. U. (2016). *Clinical Uses of Probiotics. Medicine*, *95*(5), 1–5. http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000002658

LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology, 24*(2), 160–168. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005

Malagón-Rojas, J.N. Mantziari, A., Salminen, S., & Szajewska, H. (2020). Postbiotics for preventing and treating common infectious diseases in children: A systematic review. *Nutrients*, *12*, 389. https://doi.org/10.3390/nu12020389

Martín, R., & Langella, P. (2019). Emerging health concepts in the probiotics feld: Streamlining the defnitions. *Frontiers in Microbiology, 10*. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01047

Mayorgas, A., Dotti, I., & Salas, A. (2021). Microbial metabolites, postbiotics, and intestinal epithelial function. *Molecular Nutrition & Food Research, 65*(5), 2000188. https://doi.org/10.1002/mnfr.202000188

Nataraj, B.H., Ali, S.A., Behare, P.V., &Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, *19*(1), 168. https://doi.org/10.1186/s12934–020-01426-w

Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions–a review. *International Journal of Medical Microbiology, 300*(1), 57–62. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005

Rozhkova, I.V., Yurova, E.A., & Leonova, V.A. (2023). Evaluation of the amino acid composition and content of organic acids of complex postbiotic substances obtained based on metabolites of probiotic bacteria Lacticaseibacillus paracasei ABK and Lactobacillus helveticus H9. *Fermentation, 9*(5), 460. https://doi.org/10.3390/fermentation9050460

Saulnier, D.M., Santos, F., Roos, S., Mistretta, T.A., Spinler, J.K., Molenaar, D., Teusink, B., & Versalovic, J. (2011). Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in Lactobacillus reuteri to define functional probiotic features. *PloS One, 6*(4), 183–187. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018783

Salminen, S., Collado, M.C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E.M., Sanders, M.E., Shamir, R., Swann, J.R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 18*(9), 649–667. https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6

Szydłowska, A., & Sionek, B. (2022). Probiotics and postbiotics as the functional food components affecting the immune response. *Microorganisms, 11*(1), 104. https://doi.org/10.3390/микроорганизмы11010104

Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., Gao, C., Olsen, R.E., Ran, C., & Zhou, Z. (2020). Paraprobiotics and postbiotics of probiotic Lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms. *Frontiers in Nutrition,* (7), 570344. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.49

Влияние способа получения экстрактов цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность

О. В. Кригер[1,2], **Е. И. Шепель**[1]

[1] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, Российская Федерация

[2] Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Поиск новых источников биологически активных веществ с антимикробными свойствами представляет собой важное направление в современной биотехнологии и фармакологии. Перспективным источником таких веществ является *Tagetes patula L.* (бархатцы распростертые). Водные экстракты *T. patula*, обладая значительным потенциалом биологической активности, остаются недостаточно изученными по сравнению с экстрактами, полученными с использованием других экстрагентов и методов экстракции.

Цель: Исследование влияния методов экстракции на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность водных экстрактов цветков *Tagetes patula L.* Определение зависимости между способом экстракции и содержанием биологически активных веществ, а также антибактериальными свойствами водных экстрактов для создания на их основе антимикробных препаратов. В рамках исследования выполнены задачи по определению суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах бархатцев распростертых, полученных различными методами экстракции, и тестированию экстрактов на антибактериальную активность по отношению к бактериям *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенным из клинического материала.

Материалы и методы: Объектами исследования выступали водные экстракты цветков *Tagetes patula L.* с гидромодулем 1:10, полученные кипячением, настаиванием с перемешиванием, микроволновой и ультразвуковой экстракцией. Суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов определялось на планшетном ридере BMG Labtech. Антибактериальный эффект всех полученных экстрактов оценивался стандартным диско-диффузионным методом.

Результаты: Метод экстракции значительно влияет на содержание биологически активных веществ и антибактериальную активность водных экстрактов бархатцев распростертых. Наибольшее содержание фенольных соединений наблюдалось в экстрактах, полученных микроволновой экстракцией (0,34 мг/см^3), а максимальная концентрация флавоноидов была достигнута при кипячении в течение 300 секунд (0,98 мг/см^3). Водные экстракты продемонстрировали антибактериальную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий *S. aureus* и *E. coli*, причем зона задержки роста культуры увеличивалась с продолжительностью экстракции.

Выводы: Изучено влияние различных методов экстракции на содержание фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах цветков бархатцев распростертых. Доказана антибактериальная активность экстрактов против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшего исследования водных экстрактов бархатцев распростертых, их состава и свойств для создания антимикробных препаратов, применяемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Ключевые слова: бархатцы распростертые, водные экстракты, биологическая активность, противомикробные препараты

Корреспонденция:
Кригер Ольга Владимировна
E-mail: OKriger@kantiana.ru

Конфликт интересов: авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 05.01.2023
Доработана: 29.05.2024
Принята: 15.06.2024
Опубликована: 30.06.2024

Copyright: © 2024 Авторы

Для цитирования: Кригер, О.В., & Шепель, Е.И. (2024). Влияние способа получения экстрактов цветков бархатцев распростертых *(Tagetes patula L.)* на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность. *FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 22-34. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.49

ORIGINAL EMPIRICAL RESEARCH

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.49

The Effect of the Preparation Method on the Content of Biologically Active Substances and Antimicrobial Activity of Extracts of Marigold Flowers (*Tagetes patula* L.)

Olga V. Kriger[1,2], Ekaterina I.Shepel[1]

1 Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

2 ITMO University, St. Perersburg, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: The search for new sources of biologically active substances with antimicrobial properties represents a significant direction in modern biotechnology and pharmacology. A promising source of such substances is *Tagetes patula L.* (French marigold). Despite the high potential biological activity of aqueous extracts of *T. patula*, they remain insufficiently studied compared to extracts obtained using other solvents and extraction methods.

Purpose: The aim of this study is to investigate the influence of extraction methods on the content of biologically active substances and the antimicrobial activity of aqueous extracts of *Tagetes patula L.* flowers. The study aims to determine the relationship between the extraction method and the content of biologically active substances, as well as the antibacterial properties of the aqueous extracts to create antimicrobial agents based on them. The research objectives included determining the total content of phenolic compounds and flavonoids in aqueous extracts of French marigolds obtained by various extraction methods, and testing the extracts for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria isolated from clinical material.

Materials and Methods: The objects of the study were aqueous extracts of *Tagetes patula L.* flowers with a hydromodule of 1:10, obtained by boiling, infusing with stirring, microwave, and ultrasonic extraction. The total content of phenolic compounds and flavonoids was determined using a BMG Labtech plate reader. The antibacterial effect of all obtained plant extracts was assessed using the standard disk diffusion method.

Results: The extraction method significantly influences the content of biologically active substances and the antibacterial activity of aqueous extracts of French marigolds. The highest phenolic compound content was observed in extracts obtained by microwave extraction (0.34 mg/cm^3), while the maximum flavonoid concentration was achieved by boiling for 300 seconds (0.98 mg/cm^3). The aqueous extracts demonstrated antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria *S. aureus* and *E. coli*, with an increasing trend in the inhibition zone diameter proportional to the extraction duration.

Conclusion: The study examined the impact of various extraction methods on the total content of phenolic compounds and flavonoids in aqueous extracts of French marigold flowers. The antibacterial activity of the extracts against gram-positive and gram-negative bacteria was confirmed. The obtained data indicate the potential for further research into the composition and properties of aqueous extracts of French marigolds for the development of antimicrobial agents for use in medicine, veterinary science, and agriculture.

Keywords: French marigold, aqueous extracts, biological activity, antimicrobial agents Tagetes patula L., aqueous extracts, biological activity

Correspondence:
Kriger Olga
E-mail: OKriger@kantiana.ru

Conflict of interest:
The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 05.01.2023
Revised: 29.05.2024
Accepted: 15.06.2024
Published: 30.06.2024

Copyright: © 2024 The Authors

To cite: Kriger, O.V., & Shepel, E.I. (2024). The effect of the preparation method on the content of biologically active substances and antimicrobial activity of extracts of marigold flowers *(Tagetes patula L.). FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 22-34. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.49

ВВЕДЕНИЕ

Издавна традиционные растительные препараты играли важную роль в жизни человека и являлись природными источниками здоровья. Однако, большой объем производства и широкое использование синтетических средств и антибиотиков наносит существенный ущерб окружающей среде и здоровью человека. Так, в 2022 г. проведено наиболее полное исследование загрязнений водоемов остатками фармацевтических средств (исследовано 1052 места отбора проб вдоль 258 рек в 104 странах), которое показало, что более чем в четверти исследуемых местностей концентрация выявленных загрязнений представляет опасность для окружающей среды и здоровья человека (Wilkinson, 2022).

Поэтому активно ведутся поиски новых источников биологически активных вещество (БАВ) и способов получения безопасных противомикробных растительных препаратов, используемых в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, что является актуальным направлением современной биотехнологии и фармокологии (Кацев, 2023).

Перспективным источником биологически активных веществ является *Tagetes patula* L. (бархатцы распростертые), которое используется в народной медицине и сельском хозяйстве благодаря наличию широкого спектра полезных свойств. Растение обладает антибактериальными, антипаразитарными, противовирусными и антиоксидантными свойствами (Папаяни, 2012). Кроме того, бархатцы имеют фунгицидные и инсектицидные свойства, поэтому они успешно применяются для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур, например, нематодами земляники, картофеля и др. (Астафьева, 2020). Антисептические, бактерицидные, консервирующие свойства бархатцев обусловлены наличием в их составе алифатического углеводорода лимонена, смеси ациклических монотерпеновых углеводородов: α-оцимена, β-оцимена, бициклического терпена пинена и других биологически активных веществ (Gupta, 2012).

Флавоноиды являются вторичными метаболитами растений и придают окраску цветкам бархатцев. Они обладают широким спектром биологической активности. В настоящее время получены сведения об антиоксидантной активности экстрактов бархатцев (Червонная, 2015), изучалась их роль в защите растений от окислительного стресса (Машковский, 2019). Однако антимикробные свойства бархатцев распростертых, обуславливающих устойчивость растений к бактериальным, грибковым и вирусным инфекциям, изучены недостаточно.

Качественные и количественные исследования биологически активных соединений из растительного сырья в основном основаны на выборе эффективного метода экстракции. Экстракция является первым этапом исследования любого лекарственного растения, играет значительную и решающую роль в конечном результате. Основными проблемами традиционной экстракции являются более длительное время экстракции, необходимость использования дорогостоящего растворителя высокой чистоты, испарение больших количеств растворителя, низкая селективность экстракции и термическое разложение термолабильных соединений (Croteau et al., 2000). Чтобы преодолеть эти ограничения внедряются новые методы извлечения биологически активных веществ из растительного сырья. Одними из таких методов являются ультразвуковая и микроволновая экстракция.

Эффективность процесса ультразвуковой экстракции объясняется кавитационным эффектом, при котором происходит разрушение клеточных стенок растительного сырья и образование диффузионных микротоков, обеспечивающих выход клеточного сока, содержащего биологически активные вещества и растворение его в экстрагенте (Поверин, 2006). Вероятным механизмом ультразвукового воздействия является интенсификация массопереноса и ускоренный доступ растворителя к клеточным материалам частей растения. Содержание влаги в образце, степень измельчения, размер частиц и растворитель являются очень важными факторами для эффективной экстракции (Салова, 2016). Кроме того, температура, давление, частота и продолжительность также оказывают влияние на эффективность процесса ультразвуковой обработки (Елапов, 2021). Ультразвуковую экстракцию используют для извлечения биологически активных веществ из растительного сырья наряду с различными классическими методами, поскольку она позволяет повысить эффективность процесса. Её преимущества включают сокращение времени экстракции, энергии и растворителя (Chemat, 2008).

Экстракция с использованием микроволновой энергии также рассматривается как современный метод извлечения растворимых продуктов в жидкость из широкого

спектра материалов (Маркин, 2014). Принцип нагрева с использованием микроволновой энергии основан на ее прямом воздействии на полярные материалы. Электромагнитная энергия преобразуется в тепло в соответствии с механизмами ионной проводимости и вращения диполей (Jain, 2009). Предполагается, что механизм экстракции с помощью микроволн включает три последовательных этапа: (1) отделение растворенных веществ от активных центров матрицы образца при повышенной температуре и давлении; (2) диффузия растворителя в матрицу образца; (3) высвобождение растворенных веществ из матрицы образца в растворитель (Alupului, 2012). Микроволновая экстракция обладает такими преимуществами как простота, селективность и эффективность. Она также признана экологически чистой технологией, поскольку сокращает использование органических растворителей. Более того, данный метод уменьшает продолжительность экстрагирования (Pan, 2003).

Водная экстракция является одним из дешевых и безопасных способов извлечения биологически активных веществ из цветков *Tagetes patula* L. У воды, как экстрагента, есть неоспоримые положительные свойства — доступность, безопасность, фармакологическая индифферентность и бюджетность. Водные экстракты *T. patula* могут проявлять заметную биологическую активность, причем она зависит от способа экстрагирования, в результате которого они были получены. Так, например, горячий водный экстракт цветков *T. patula*, полученный кипячением, оказался наиболее эффективными по сравнению с холодным водным экстрактом (Астафьева, 2020)

В исследованиях Munhoz (2017) изучено влияние горячего водного экстракта цветков *T. patula*, полученного кипячением, на рост, урожайность и болезни растений томатов. Применение экстракта обусловило значительное увеличение высоты побега, количества ветвей, листьев, бутонов, цветков и плодов томата, при значительном снижении различных заболеваний томата по сравнению с контролем. Тем не менее, биологическая активность водных экстрактов цветков *T. patula* изучена недостаточно в отличие от водно-спиртовых экстрактов. Актуальным является рассмотрение водной экстракции БАВ из цветков бархатцев. Кроме того, мало внимания уделяется изучению зависимости выхода БАВ и биологической активности экстрактов в зависимости от различных способов экстракции и их параметров.

Целью данного исследования является установление влияния способа экстракции на содержание биологически активных веществ и антимикробную активность получаемых водных экстрактов цветков *Tagetes patula L.* В рамках проведенных исследований выполнены задачи по определению суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов, обладающих антимикробными свойствами в водных экстрактах бархатцев распростертых, получаемых различными методами экстракции, тестированию экстрактов на антибактериальную активность по отношению к выделенным из клинического материала бактериям *Staphylococcus aureus, Escherichia coli.*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования на разных этапах работы являлись водные экстракты цветков *Tagetes patula L.*, собранных в период цветения в августе 2023 г. в г. Калининграде с гидромодулем 1:10, полученные разными способами.

Материалы

На различных этапах исследования для приготовления и изучения биологической активности экстрактов бархатцев распростёртых использовали воду дистиллированную (ГОСТ 6709–72); нитрит натрия, ≥ 97.0% (Sigma-Aldrich); алюминий хлористый 6-водный, ч.д.а. (ГОСТ 3759–75); гидроокись натрия, х.ч. (ГОСТ 4328–77); рутина гидрат, ≥ 94% (Sigma-Aldrich); реактив Фолина-Чокальтеу, 2Н (ЛенРеактив); натрий углекислый, ч.д.а. (ГОСТ 83–79); галловую кислоту (Русхим); агар Мюллера-Хинтона II (Оболенск, ТУ 9385–227-78095326–2015); питательную среду №1 ГРМ (Оболенск, ТУ 9398–001-78095326–2006); питательную среду №2 ГРМ (Сабуро) (Оболенск, ТУ 9398–002-78095326–2006); антибиотики дисковые (НИЦФ).

Оборудование

Аппаратура и материалы, используемые в работе: ультразвуковая ванна Bandelin RK 102 H, Sonorex Super, с нагревом (частота колебаний ультразвукового воз-

действия 20–22 кГц и интенсивность 1–70 Вт/см^2); весы аналитические AND GH-252; весы электронные технические ГОСМЕТР ВЛТЭ-5100Т; нагревательная лабораторная плитка SCHOTT SLH 230; микроволновая печь OASIS MW-70MW (частота электромагнитного излучения 2450 МГц, мощность 700 Вт); высокоскоростная центрифуга для микропробирок Eppendorf 5424; магнитная мешалка с с подогревом, Atomic Lab Prime; сушильный шкаф Binder FD53; рефрактометр автоматический HI96801; микропланшетный ридер CLARIOstar BMG Labtech; бокс микробиологической безопасности-II «Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC; автоклав Melag Euroklav 23 VS.

Методы

Определение суммарного содержания фенольных соединений в водных экстрактах цветков T. patula

Сумма фенольных соединений определялась по следующей методике. Реакционную смесь готовили путем смешивания 20 мкл экстракта, 100 мкл реагента Фолина-Чокальтеу (10 %) и 80 мкл 7,5%-го водного раствора Na_2CO_3.

Смесь растворов помещали в темное место при комнатной температуре на 30 мин после чего измеряли поглощение при 765 нм на планшетном ридере BMG Labtech.

Общую концентрацию фенольных соединений рассчитывали по калибровочной кривой, полученной с использованием стандартного раствора галловой кислоты (100–4000 мкг/мл). Данные были выражены в мг эквивалентов галловой кислоты на мл экстракта (Рисунок 1).

Затем проводился сравнительный анализ содержания фенольных соединений в исследуемых экстрактах с использованием однофакторного и двухфакторного анализов.

Определение суммарного содержания флавоноидов в водных экстрактах цветков T. patula

Сумма флавоноидов в экстрактах определялась с помощью методики [10]. В лунки 96-луночного планшета наливали 25 мкл экстракта, 100 мкл дистиллированной воды и 7,5 мкл 5%-ного нитрита натрия.

Через 6 минут в каждую лунку добавляли 7,5 мкл 10%-ного хлорида алюминия, 100 мкл 4%-ного гидроксида натрия и 10 мкл дистиллированной воды.

Планшет выдерживали в темноте, через 15 минут измеряли поглощение растворов с помощью планшетного ридера BMG Labtech при 510 нм и регистрировали среднее значение поглощения.

Та же процедура была проведена для стандартного раствора рутина для построения калибровочной кривой.

Содержание флавоноидов в экстрактах выражалось в мг эквивалентов рутина на мл экстракта (Рисунок 2).

Затем проводился сравнительный анализ содержания флавоноидов в исследуемых экстрактах с использованием однофакторного и двухфакторного эксперимента.

Рисунок 1

Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации галловой кислоты

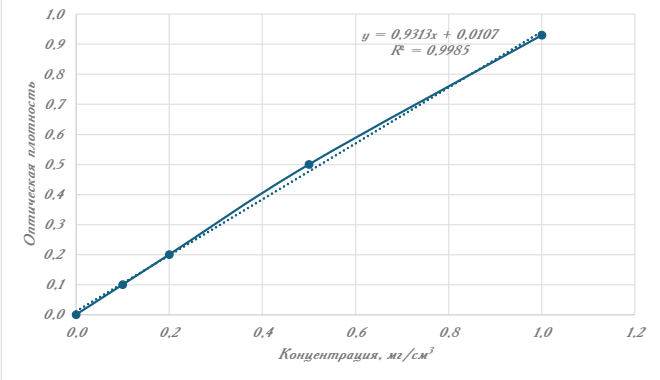
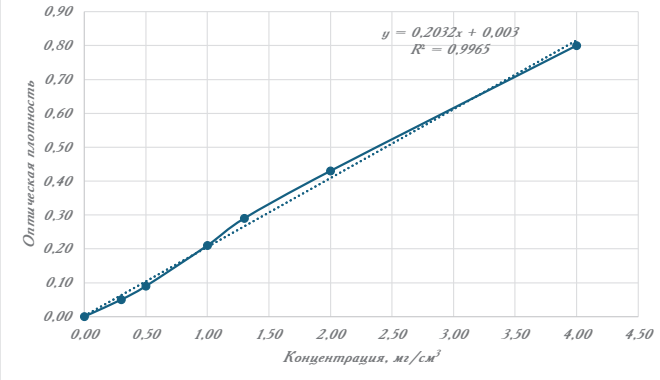


Рисунок 2

Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации рутина



Определение антибактериальной активности экстрактов цветков T. patula

Определение антибактериального эффекта всех полученных растительных экстрактов проводилось стандартным диско-диффузным методом.

В тестировании использовались выделенные из клинических образцов чистые культуры бактерий: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli.*

Для определения чувствительности микроорганизмов к дискам была использована стерильная питательная среда Мюллера-Хинтона II. Среда предварительно стерилизовалась при 1,5 атм в течение 15 минут.

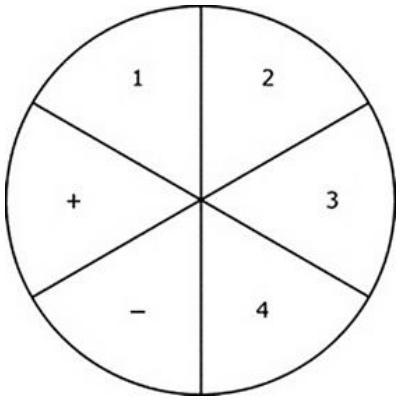
Для сравнительной оценки антимикробной активности растительных экстрактов в качестве положительного контроля использовался диск со следующим антибиотиком: для *Staphylococcus aureus* — клиндамицин (2 мкг), для *Escherichia coli* — амоксициллин/клавулановая кислота (20/10 мкг), а в качестве отрицательного — дистиллированная вода.

Посев микроорганизмов проводился в стерильных условиях в ламинарном боксе LAMSYSTEMS.

Суспензии бактерий получали путём взбивания тампоном со взятой культурой в физрастворе, мутность составляла 0,5 по шкале МакФарланда.

Рисунок 3

Схематическое изображение расположения дисков



Примечания. «+» – положительный контроль;
«-» – отрицательный контроль;
1–4 – испытуемый водный экстракт

Тампоном производился рассев суспензии на твердые среды в чашках Петри в технике сплошного газона по всей поверхности агара до впитывания в агар.

Заранее подготовленные бумажные диски, опущенные в экстракты, а также диски с антибиотиком и дистиллированной водой, после посева микроорганизмов размещались по одному на каждую зону чашки Петри с соответствующим штаммом. Схема расположения дисков показана на Рисунке 3. Далее чашки помещались в термостат с температурой 37 °C на 16 ч. По окончании времени инкубации чашки вынимались из термостата и измерялся диаметр зон лизиса вокруг дисков.

Процедура исследования

Исследование состояло из нескольких последовательных этапов, включающих в себя определение суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов в зависимости от продолжительности экстракции при воздействии высоких температур, ультразвука и микроволновой энергии. На следующем этапе исследований изучалась антибактериальная активность полученных экстрактов с применением диско-диффузионного метода по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям, изолированным из клинического материала.

Для приготовления экстрактов сухое сырье измельчали ножницами. Размер частиц не более 2 мм (сырье пропускали через сито с размером ячеек 2 мм).

К 2 г измельченного сырья добавляется 20 $см^3$ воды. Колбы закрывали сверху фольгой, после чего экстракционный материал настаивали в течение 60 минут при комнатной температуре для набухания сырья. Далее проводили экстракцию по каждому из четырех способов (Таблица 1).

Таблица 1

Способы экстракции бархатцев распростёртых

Кипячение на плитке	Настаивание с перемешиванием 70 °C, 1000 об/мин	Ультразвуковая экстракция, 20 кГц, 30 Вт/$см^2$	Микроволновая экстракция, 2450 МГц, 350 Вт
300 с	300 с	30 с	30 с
900 с	900 с	90 с	60 с
1800 с	1800 с	180 с	
3600 с	3600 с	300 с	

После экстракции по способу материал отфильтровывали через фильтр и центрифугировали со скоростью 7000 об/мин в течение 3 мин для удаления балластных веществ. Для предотвращения биологической порчи водных экстрактов их хранили в холодильнике при температуре 1 °C. С момента приготовления экстракта до его полного исследования должно пройти не более суток. Далее определяли суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов с помощью микропланшетного ридера.

Анализ данных

Статистическая обработка осуществлялась с помощью IBM SPSS Statistics 22. Измерения проводились в трех повторностях, для полученных результатов находилось среднее ± стандартное отклонение. Сравнительный анализ содержания биологически активных веществ в исследуемых экстрактах проводился с помощью однофакторного и двухфакторного анализов с использованием критерия Шапиро-Уилка и Тьюки (при уровне значимости $p < 0,05$).

Для выполнения однофакторного дисперсионного анализа необходимо выполнение следующих условий: 1) имеется количественный непрерывный тип данных, 2) выборки независимые между собой, 3) нормальность распределения признаков «сумма фенольных соединений» и «сумма флавоноидов»; 4) равенство дисперсий исследуемых признаков. Первые два условия выполняются, необходимо проверить остальные, для каждого способа экстракции отдельно. Каждая последующая операция осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 27.

РЕЗУЛЬТАТЫ

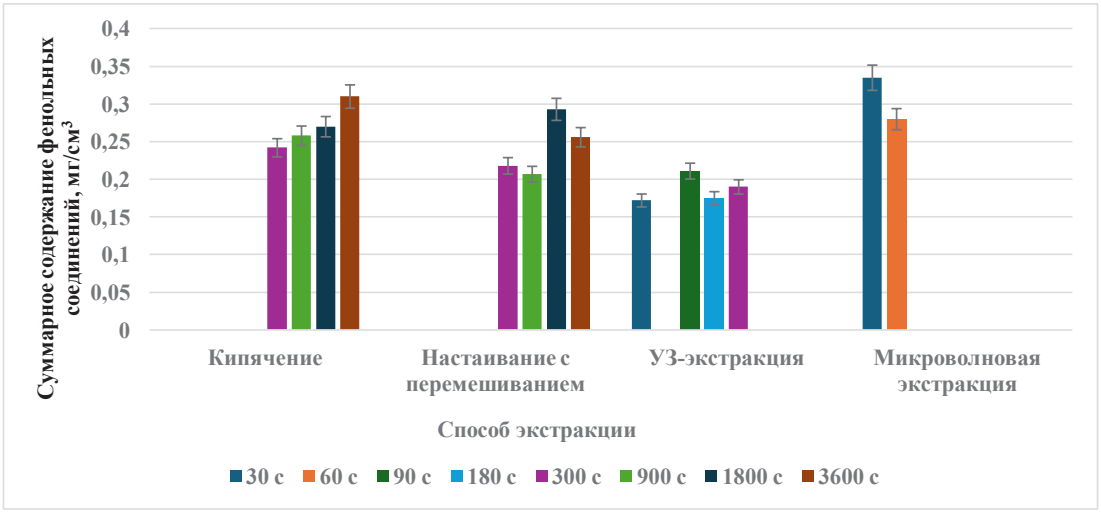
Представлены результаты исследования суммарного количества фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах бархатцев распростертых, полученных различными способами в зависимости от продолжительности экстракции, проведена статистическая обработка результатов и изучены антимикробные свойства экстрактов.

Суммарное содержание фенольных соединений в водных экстрактах цветков *T. patula*

Концентрацию фенольных соединений в экстрактах, полученных кипячением, настаиванием, ультразвуковой и микроволновой экстракцией находили по уравнению градуировочного графика (Рисунок 1). На Рисунке 4 приведены результаты содержания суммарного количества фенольных соединений в зависимости от способа получения экстрактов и продолжительности процесса.

Рисунок 4

Суммарное содержание фенольных соединений в экстрактах *T. patula* в зависимости от продолжительности экстракции



Результаты однофакторного дисперсионного анализа свидетельствуют о наличии достоверных различий по средней сумме фенольных соединений при разном времени экстракции, за исключением УЗ-экстракции ($F = 2{,}643$; $p \geq 0{,}05$) и микроволновой экстракции ($F = 4{,}344$; $p \geq 0{,}05$). Так как рассчитанные уровни значимости во всех градациях переменной «продолжительность экстракции» превышают уровень значимости $\alpha = 0{,}05$, это дает основание принять нулевую гипотезу об отсутствующем влиянии фактора на признак. Продолжительность экстракции достоверно влияет на содержание фенольных соединений лишь в экстрактах, получаемых кипячением и экстракцией настаиванием с перемешиванием.

Апостериорный критерий Тьюки (HSD) показал отсутствие ($p > 0{,}05$) достоверных различий средней суммы фенольных соединений при кипячении в течении 300 с, 900 с и 1800 с (0,242, 0,258 и 0,270 мг/см^3 соответственно), а также 1800 с и 3600 с (0,270 и 0,310 мг/см^3 соответственно).

При экстракции настаиванием с перемешиванием достоверное различие средней суммы фенольных соединений отсутствует при длительности 300 с и 900 с (0,218 и 0,207 мг/см^3 соответственно), 300 с и 3600 с (0,218 и 0,256 мг/см^3) и 1800 с и 3600 с (0,292 и 0,256 мг/см^3).

Для выявления насколько сильно способ получения влияет на содержание фенольных соединений в экстрактах использовали двухфакторный дисперсионный анализ. Установлено, что фактор «способ получения» имеет частичную эта-квадрат (88,3 %) большую, чем фактор «продолжительность экстракции» (44,6%). Это значит, что данный фактор оказывает наибольший эффект на сумму фенольных соединений, чем фактор «продолжительность экстракции», а также взаимодействие этих двух факторов.

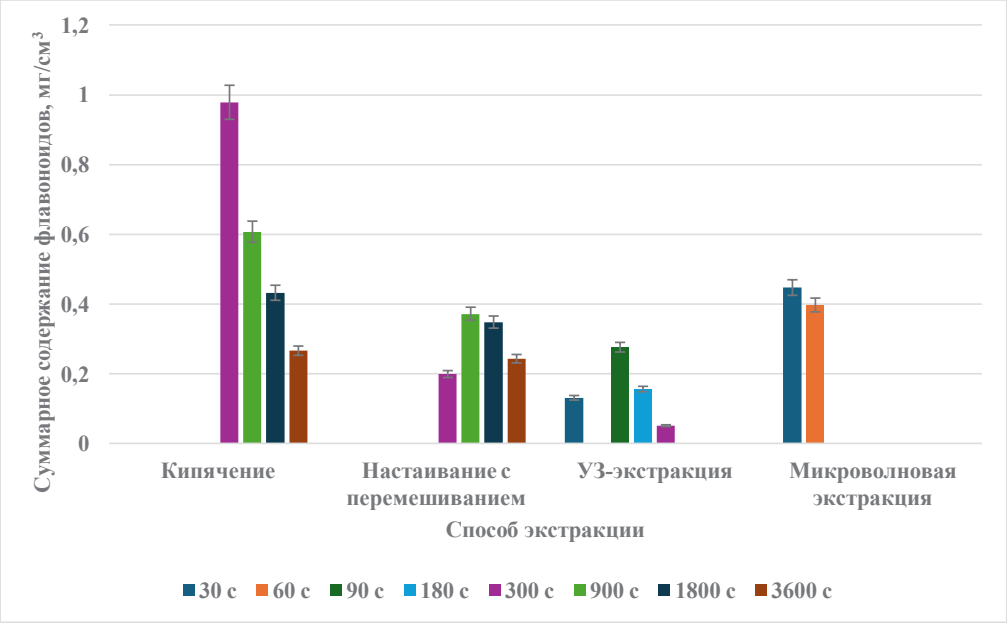
Суммарное содержание флавоноидов в водных экстрактах цветков *T. patula*

Концентрацию флавоноидов находили по уравнению градуировочного графика в соответствии с известной концентрацией рутина (Рисунок 2). На Рисунке 5 представлен график, демонстрирующий динамику выхода флавоноидов в зависимости от продолжительности для всех способов экстракции.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа результатов проведенных исследований свидетельствуют о наличии достоверных различий по средней сумме флавоноидов при разной продолжительности экстракции, за исключением микроволновой экстракции ($F = 0{,}482$;

Рисунок 5

Суммарное содержание флавоноидов в экстрактах *T. patula* в зависимости от продолжительности экстракции



$p \geq 0,05$). Рассчитанный уровень значимости превышает $\alpha = 0,05$, что дает основание принять нулевую гипотезу об отсутствующем влиянии фактора на признак. Продолжительность экстракции достоверно влияет на содержание флавоноидов в экстрактах, получаемых кипячением, настаиванием с перемешиванием и УЗ-экстракцией.

Апостериорный критерий Тьюки (HSD) показал отсутствие ($p > 0,05$) достоверных различий средней суммы флавоноидов при обычном кипячении в течении 1800 с и 3600 с (0,432 и 0,266 мг/см^3 соответственно), а также 15 и 30 мин (0,607 и 0,432 мг/мл соответственно). При экстракции настаиванием с перемешиванием достоверное различие средней суммы флавоноидов отсутствует при длительности 300 с и 3600 с (0,199 и 0,243 мг/см^3 соответственно), 1800 с и 3600 с (0,348 и 0,243 мг/см^3), и 900 с и 1800 с (0,372 и 0,348 мг/см^3). При УЗ-экстракции достоверно отличаются только 30 с и 90 с.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа по отношению к суммарному содержанию флавоноидов в экстрактах показали, что фактор «способ получения» имеет частичную эта-квадрат (87,7 %) большую, чем фактор «продолжительность экстракции» (70,3 %). Это значит, что данный фактор оказывает наибольший эффект на сумму флавоноидов, чем фактор «продолжительность экстракции», а также взаимодействие этих двух факторов. Таким образом, выход флавоноидов в экстрактах сильно зависит от способа их получения.

Результаты определения антибактериальной активности водных экстрактов цветков *T. patula*

В данной серии экспериментов тестирование антимикробных свойств экстрактов *T. patula* в зависимости от продолжительности экстрагирования осуществляли на примере экстрактов, полученных настаиванием с перемешиванием на магнитной мешалке.

Результаты исследований показали, что экстракты наиболее эффективны по отношению к *E. coli* из кожи, при этом наблюдается тенденция увеличения зоны лизиса от продолжительности экстракции. Это подтверждает антибактериальную активность входящих в состав экстрактов биологически активных веществ. При использовании других клинических образцов экстракты действовали выборочно, выраженных зависимостей не выявлено.

Обсуждение результатов

По результатам проведенных экспериментов и их сравнительного статистического анализа установлено, что способ получения оказывает значительное влияние на содержание биологически активных веществ, таких как полифенольные соединения и флавоноиды в водных экстрактах цветков бархатцев распростёртых. Определено, что наибольшая сумма фенольных соеди-

Таблица 2

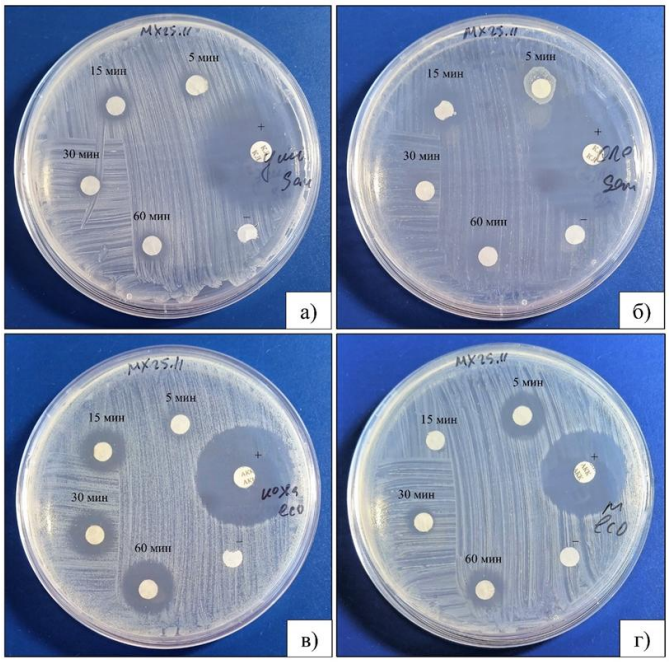
Диаметр зон задержки роста, мм

Клинический изолят	Продолжительность экстракции				«+»	«-»
	5 мин	15 мин	30 мин	60 мин		
S. aureus (уши)	8,0	10,9	8,1	9,7	32,5	-
S. aureus (опо*)	14,1	12,8	-	9,8	34,8	-
E. coli (кожа)	8,2	14,3	15,0	16,9	29,6	-
E. coli (моча)	14,3	-	9,2	12,4	24,2	-

Примечание. *отделяемое половых органов

Рисунок 6

Антибактериальная активность водных экстрактов *T. patula*, полученных с помощью магнитной мешалки, по отношению к: (а) *S. aureus* из ушей, (б) *S. aureus* из опо, (в) *E. coli* из кожи, (г) *E. coli* из мочи



нений (0,34 мг/см^3) приходится на экстракты, полученные с помощью микроволновой экстракции в течение 30 с при мощности 350 Вт и частоте 2450 МГц. Это подтверждает эффективность применения микроволновой экстракции в качестве альтернативного метода для извлечения биологически активных веществ из бархатцев распростёртых, характеризующегося низкой продолжительностью воздействия на компонентный состав сырья и способствующий большему выходу соединений, обладающих высокой биологической активностью.

В отношении флавоноидов оптимальным методом оказалось кипячение в течение 300 с. Дальнейшее кипячение характеризовалось набуханием сырья, уменьшением количества воды и снижением концентрации флавоноидов, что свидетельствует о недостаточности используемого в работе гидромодуля.

Наименьшие результаты выхода как фенольных соединений, так и флавоноидов наблюдались при УЗ-экстракции. Очевидно, это связано с низкой амплитудой и недостаточной продолжительностью применяемого ультразвукового воздействия. При этом многие исследователи отмечают, что УЗ-экстракция является перспективным подходом для извлечения комплексов биологически активных веществ из лекарственного и растительного сырья и может повысить выход биологически активных соединений при водной экстракции свежего сырья (Petkova, 2017; Sukhikh, 2022).

Основными параметрами, влияющими на выход биологически активных веществ и их активность, при ультразвуковой экстракции являются мощность и частота ультразвука, а также температура и продолжительность процесса (Dzah, 2020). Кроме того, помимо увеличения выхода БАВ УЗ-экстракция способствует увеличению сроков хранения водных экстрактов за счет асептического действия. В исследованиях Madhu (2019) установлено снижение количества бактерий группы кишечной палочки, сальмонелл, дрожжей и плесневых грибов в ультразвуковых экстрактах в зависимости от параметров проведения процесса.

В этой связи в дальнейших исследованиях планируется осуществление оптимизации параметров ультразвуковой водной экстракции биологически активных веществ из цветков бархатцев распростертых и изучения их антимикробной активности.

В ходе тестирования антибактериальной активности водных экстрактов цветков бархатцев распростертых установлено, что экстракты проявляли бактерицидное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, выделенных из различного клинического материала. Зона лизиса по отношению к *S. aureus* (уши) составляла 9,7 мм; *S. aureus* (опо) — 9,8 мм. Относительно грамотрицательных бактерий также установлен бактерицидный эффект. Зона подавления роста *E. coli* (кожа) — 16,9 мм, *E. coli* (моча) — 12,4 мм.

Выявлена корреляция между продолжительностью экстрагирования и зоной ингибирования роста *E. coli* (кожа). В случае других клинических образцов экстракты действовали выборочно. Это возможно связано с тем, что экстракты с разной продолжительностью экстракции и разным способом получения имеют индивидуальный состав входящих компонентов (БАВ), которые могут быть избирательно активны по отношению к определенному штамму. Это требует дополнительных исследований, связанных с изучением подробного химического состава водных экстрактов *T. patula*.

Антимикробные свойства водных экстрактов соцветий бархатцев распростертых подтверждаются в исследованиях Астафьевой (2020). Водные экстракты соцветий *T. patula*, полученные путем пятикратного кипячения в течение 1 часа или настаиванием при комнатной температуре в течение 3 суток проявляли выраженную антибактериальную активность. При этом, в отношении грамотрицательной культуры *E. coli* водные экстракты проявляли большую активность по сравнению с водно-спиртовыми экстрактами. Диаметр зоны ингибирования у горячих водных экстрактов составлял 23,0 мм; у экстрактов, полученных настаиванием — 35,0 мм. По сравнению с ними у водно-спиртовых экстрактов зона ингибирования достигала значений 15,0 мм и 16,0 мм у горячих и холодных экстрактов соответственно. Несмотря на высокую биологическую активность водных экстрактов с увеличением продолжительности хранения они утрачивали свои антимикробные свойства.

Антимикробные свойства водных экстрактов цветков бархатцев распростертых обуславливаются наличием в их составе соединений фенольной природы и флавоноидов. Представляет интерес изучение биологически активных соединений не фенольной природы, оказывающих влияние на противомикробную активность водных экстрактов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние традиционных и альтернативных способов получения водных экстрактов цветков бархатцев распростертых на суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов, доказана антибактериальная активность экстрактов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности изучения водных экстрактов бархатцев распростертых, их состава и свойств для создания противомикробных препаратов различного назначения для использования в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве.

Научный и практический интерес представляет изучение фунгицидной активности водных экстрактов цветков бархатцев распростёртых и создание на их основе биопрепаратов для борьбы с возбудителями болезней и порчи сельскохозяйственных растений.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Кригер Ольга Владимировна: концептуализация, курирование данных, рецензирование и редактирование рукописи.

Шепель Екатерина Игоревна: визуализация, проведение исследования, подготовка черновика рукописи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Астафьева, О. В., Жаркова, З. В., & Якимец М. В. (2020). Исследование химического состава и противомикробной активности экстрактов из соцветий *Tagetes patula L. Современные проблемы науки и образования, 6*, 10. https://doi.org/10.17513/spno.30430

Astafyeva, O. V., Zharkova, Z. V., & Yakimets M. V. (2020). Investigation of the chemical composition and antimicrobial activity of extracts from inflorescences of *Tagetes patula L. Modern Problems of Science and Education*, *6*, 10. https://doi.org/10.17513/spno.30430

Васильев, А. С., & Громова, Ю. В. (2018). Краткий анализ современных технологий экстракции и основных факторов, влияющих на процесс экстракции. *Экономическая наука сегодня: теория и практика* (с. 28–31). Чебоксары: Центр научного сотрудничества "Интерактив плюс".

Vasiliev, A. S., & Gromova, Yu. V. (2018). A brief analysis of modern extraction technologies and the main factors influencing the extraction process. *Economics Today: Theory and Practice* (pp. 28–31). Cheboksary: Center for Scientific Collaboration "Interactive Plus". https://doi.org/10.21661/a-537

Елапов, А. А., Кузнецов, Н. Н., & Марахова, А. И. (2021). Применение ультразвука в экстракции биологически активных соединений из растительного сырья, применяемого или перспективного для применения в медицине. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, *10*(4), 96–116. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116

Elapov, A. A., Kuznetsov, N. N., & Marakhova, A. I. (2021). The use of ultrasound in the extraction of biologically active compounds from plant raw materials used or promising for use in medicine. *Razrabotka i Registraciâ Lekarstvennyh Sredstv, 10*(4), 96–116. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116

Кацев, А.М., Сафронюк, С.Л., Бурцева Е. В., & Османова С. Я. (2023). Могут ли биолюминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения? *Разработка и регистрация лекарственных средств, 12*(4), 63–70. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592

Katsev, A.M., Safronyuk, S.L., Burtseva, E.V., & Osmanova, S.Ya. (2023). Can bioluminescent bacteria be used to search for new antibacterial substances of plant origin? *DRazrabotka i Registraciâ Lekarstvennyh Sredstv*, *12*(4), 63–70. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592

Максименко, Н. В. (2019). Аллелопатическая активность растений рода Tagetes L. *Сельское хозяйство-проблемы и перспективы* (с. 79–85). Гродно: ГГАУ.

Maksimenko, N. V. (2019). Allelopathic activity of plants of the genus Tagetes L. *Agriculture–problems and prospects* (p. 79–85). Grodno: GGAU.

Маркин, В.И., Чепрасова, М.Ю., & Базарнова, Н.Г. (2014) Основные направления использования микроволнового излучения при переработке растителного сырья (обзор). *Химия растительного сырья,* (4), 21–42. https://doi.org/10.14258/jcprm.201404597

Markin, V.I., Cheprasova, M.Yu., Bazarnova, N.G. (2014) The main directions of using microwave radiation in the processing of plant raw materials (review). *Chemistry of Plant Raw Material,* (4), 21–42. https://doi.org/10.14258/jcprm.201404597

Машковский, М.Д. (2019). *Лекарственные средства*. Москва: Новая волна.

Mashkovsky, M.D. (2019). *Medicines*. Moscow: New wave.

Салова, Т. Ю., & Громова, Н. Ю. (2016). Теоретические аспекты получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья. *Успехи современного естествознания,* (3), 39–43.

Salova, T. Y., Gromova, N. Y. (2016). Theoretical aspects of obtaining biologically active substances from plant and animal raw materials. *Advances in Current Natural Sciences,* (3), 39–43.

Папаяни, О. И., Духанина, И.В., & Сергеева, Е. О. (2012) Изучение химического состава и антимикробной активности сухого экстракта из цветков бархатцев распростертых (Tagetes patula L.). *Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 14*(3), 742–744.

Papayani, O. I., Dukhanina, I.V., & Sergeeva, E. O. (2012) Study of the chemical composition and antimicrobial activity of a dry extract from marigold flowers (Tagetes patula L.). *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 14*(3), 742–744.

Поверин, Д.И., & Поверин, А.Д. (2006) Ультразвуковая экстракция в промышленном производстве инстантных форм растительных субстратов. *Пиво и напитки*, (1), 18–20.

Poverin, D.I., & Poverin, A.D. (2006) Ultrasonic extraction in the industrial production of instant forms of plant substrates. *Beer and Beverages,* (1), 18–20.

Червонная, Н.М., & Андреева, О. А. (2015). Об антиоксидантной активности спиртоводных извлечений из цветков бархатцев распростертых. *Современные проблемы науки и образования*, *2*(часть 3).

Chervonnaya, N.M., & Andreeva, O. A. (2015) On the antioxidant activity of alcoholic extracts from marigold flowers. *Modern Problems of Science and Education, 2*(part 3).

Alupului, A., Calinescu, I. & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series* B, *74*(2), 129–142.

Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive Compounds in Plants-Benefits and Risks for Man and Animals, 50*, 11–17.

Chemat, F., Tomao, V., & Virot, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of food analysis instruments, 11*, 85–103. https://doi.org/10.1201/9781420045673.ch5

Chookalaii, H., Riahi, H., Shariatmadari, Z., Mazarei, Z., & Seyed Hashtroudi, M. (2020). Enhancement of total flavonoid and phenolic contents in Plantago major L. with plant growth promoting cyanobacteria. *Journal of Agricultural Science and Technology, 22*(2), 505–518.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews, 12*(4), 564–582. https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564

Croteau, R. Kutchan, T.M., & Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 24*, 1250–1319.

De Castro, M. D. L. & Garcıa-Ayuso L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta, 369*(1–2), 1–10. http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5

Dudareva, N., & Pichersky, E. (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology*, *122*(3), 627–634. https://doi.org/10.1104/pp.122.3.627

Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience, 35*, 100547. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547

Gupta, P., Vasudeva, N., & Marigold, A. (2012). Potential ornamental plant drug. *Hamdard Medicus, 55*(1), 45–59.

Hernández, Y., Lobo M. G., & González, M. (2009). Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry, 114*(2), 734–741. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.021

Herrera, M.C., & De Castro, M.D.L. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A, 1100*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.021

Jain, R., Katare, N., Kumar, V., Samanta, A.K., Goswami, S., & Shrotri S. (2012). In vitro antibacterial potential of different extracts of Tagetes erecta and Tagetes patula. *Journal of Natural Sciences Research*, *2*(5), 84–90.

Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas A., & Shukla, S.S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents–an overview. *Asian Journal of Research in Chemistry, 2*(1), 19–25.

Madhu, B., Srinivas, M. S., Srinivas, G., & Jain S. K. (2019). Ultrasonic technology and its applications in quality control, processing and preservation of food: A review. *Current Journal of Applied Science and Technology, 32*(5), 1–11. https://doi.org/ 10.9734/CJAST/2019/46909

Mahfuz, S., Shang, Q., & Piao X. (2021). Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets. *Biotechnol, 12*, 48. https://doi.org/10.1186/s40104-021-00565-3

Martínez, R., Diaz, B., Vásquez, L., Compagnone, R., Tillett, S.S., Canelon, D., Torrico, F., & Suarez A. (2009). Chemical composition of essential oils and toxicological evaluation of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* from Venezuela. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 12*(4), 476–481. https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643747

Munhoz, V.M., Baida, F.C., Lopes, G.C., Santiago, D.C., de Souza, J.R.P., & de Mello, J.C.P. (2017). Extracts and semi-purified fractions of Tagetes patula flowers in the control of root-knot nematodes. *Semina: Ciências Agrárias,* 38(6), 3529–3538. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n6p3529

Nahak, G., & Sahu, K. (2017). Bio-controlling effect of leaf extract of *Tagetes patula L. (Marigold)* on growth parameters and diseases of tomato. *Pakistan Journal of Biological Sciences, 20*(1), 12–19. https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.12.19

Pan, X., Niu G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 42*(2), 129–133. https://doi.org/10.1016/s0255-2701(02)00037-5

Ondua, M., Njoya, E. M., & Abdalla M. A. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology, 234*, 27–35. https://doi.org/10.1016/ j.jep.2018.12.030

Smith, R. M. (2003). Before the injection—Modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography, 1000*(1–2), 3–27. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00511-9.

Sukhikh, S., Babich, O., Larina, V., Krol O., Popov, A., Kriger, O., Ivanova S., & Prosekov, A. (2022). Antimicrobial screening and fungicidal properties of eucalyptus globulus ultrasonic extracts. *Plants,* 11. https://doi.org/10.3390/plants11111441

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology, 4,* 315–344. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0_5.

Vankar, P. S. (2004). Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, *9*, 30–41. https://doi.org/10.1007/BF02834854

Wilkinson, J.L., Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Leung, K.M.Y., Lai, R.W.S., Galbán-Malagón, C., Adell, A.D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R.A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Luarte, T., Petrosyan, V., Perikhanyan, Y., Mahon, C.S., McGurk, C.J., Hofmann, T., Kormoker, T., Iniguez, V., Guzman-Otazo, J., Tavares, J.L., Gildasio De Figueiredo, F., Razzolini, M.T.P., Dougnon, V., Gbaguidi, G., Traoré, O., Blais, J.M., Kimpe, L.E., Wong, M., Wong, D., Ntchantcho, R., Pizarro, J., Ying, G.G., Chen, C.E., Páez, M., Martínez-Lara, J., Otamonga, J.P., Poté, J., Ifo, S.A., Wilson, P., Echeverría-Sáenz, S., Udikovic-Kolic, N., Milakovic, M., Fatta-Kassinos, D., Ioannou-Ttofa, L., Belušová, V., Vymazal, J., Cárdenas-Bustamante, M., Kassa, B.A., Garric, J., Chaumot, A., Gibba, P., Kunchulia, I., Seidensticker, S., Lyberatos, G., Halldórsson, H.P., Melling, M., Shashidhar, T., Lamba, M., Nastiti, A., Supriatin, A., Pourang, N., Abedini, A., Abdullah, O., Gharbia, S.S., Pilla, F., Chefetz, B., Topaz, T., Yao, K.M., Aubakirova, B., Beisenova, R., Olaka, L., Mulu, J.K., Chatanga, P., Ntuli, V., Blama, N.T., Sherif, S., Aris, A.Z., Looi, L.J., Niang, M., Traore, S.T., Oldenkamp, R., Ogunbanwo, O., Ashfaq, M., Iqbal, M., Abdeen, Z., O'Dea, A., Morales-Saldaña, J.M., Custodio, M., de la Cruz, H., Navarrete, I., Carvalho, F., Gogra, A.B., Koroma, B.M., Cerkvenik-Flajs, V., Gombač, M., Thwala, M., Choi, K., Kang, H., Ladu, J.L.C., Rico, A., Amerasinghe, P., Sobek, A., Horlitz, G., Zenker, A.K., King, A.C., Jiang, J.J., Kariuki, R., Tumbo, M., Tezel, U., Onay, T.T., Lejju, J. B., Vystavna, Y., Vergeles, Y., Heinzen, H., Pérez-Parada, A., Sims, D.B., Figy, M., Good, D., Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 119*(8). https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.41

Методы получения и применение янтарной кислоты в пищевой промышленности: обзор предметного поля

О. О. Бабич[1], О. Б. Калашникова[1], Е. В. Ульрих[2], С. А. Сухих[1]

[1] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, Российская Федерация

[2] Калининградский государственный технический университет, г. Калининград, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Янтарная кислота является конечным метаболитом многих микроорганизмов. Она обладает антиоксидантными, тонизирующими свойствами, а также принимает участие в обменных процессах живого организма. Её применение в рецептуре продуктов питания будет способствовать расширению ассортимента функциональных продуктов питания, направленных на улучшения метаболизма.

Цель: описание методов получения и особенностей применения янтарной кислоты в пищевой промышленности для производства функциональных продуктов питания и биологически активных добавок к пище.

Материалы и методы: Поиск информации реализовывался в базах данных Scopus, Web of Science, PubMed, РИНЦ за период с 01.01.1994 г по 01.03.2024. Также были проанализированы отчеты о маркетинговых исследованиях в области использования янтарной кислоты в пищевой промышленности за период 2016-2023 гг. В обзор включены обзорные и эмпирические статьи, отвечающие критериям отбора, на английском и русском языках. Данный обзор предметного поля выполнен с опорой на протокол PRISMA-ScR.

Результаты: В настоящее время янтарную кислоту получают химическим или биотехнологическим методом. Наибольшую распространенность имеет химический метод (окисления парафинов, каталитического гидрирования, малеиновой кислоты или малеинового ангидрида). Существует также биотехнологический метод, основанный на культивировании микроорганизмов-продуцентов янтарной кислоты. Для культивирования микроорганизмов можно использовать различные органические субстраты, в том числе отходы пищевой промышленности. Показано, что янтарная кислота включена в список безопасных пищевых добавок и применяется при производстве пищевых продуктов в качестве регулятора кислотности. Однако в связи с тем, что она обладает доказанной биологической эффективность янтарную кислоту можно включать в рецептуры различных пищевых продуктов, тем самым наделяя их дополнительно функциональными свойствами.

Выводы: Для внедрения биотехнологического метода в реальный сектор экономики необходимо решить ряд ограничительных факторов. Установлено, что янтарная кислота может быть использована не только в качестве традиционной пищевой добавки (регулятора кислотности), но и в качестве биологически активной добавки. Объемы производства и спроса янтарной кислоты медленно, но увеличиваются, что свидетельствует о необходимости внедрения новых технологий по производству янтарной кислоты для того, чтобы удовлетворить спрос на данный продукт.

Ключевые слова: янтарная кислота, клеточная инженерия, сукцинилирование, функциональные продукты питания, пищевые добавки, здоровье человека

Корреспонденция:
Бабич Ольга Олеговна
E-mail: olich.43@mail.ru

Конфликт интересов:
авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.11.2023
Доработана: 23.05.2024
Принята: 15.06.2024
Опубликована: 30.06.2024

Финансирование:
Статья выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, соглашение № 23-26-00091.

Copyright: © 2024 Авторы

Для цитирования: Бабич, О.О., Калашникова, О.Б., Ульрих, Е.В., & Сухих, С.А. (2024). Методы получения и применение янтарной кислоты в пищевой промышленности. *FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 35-47. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.41

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.41

Methods for obtaining and using succinic acid in the food industry: A Scoping Review

Olga O. Babich[1], Olga B. Kalashnikova[1], Elena V. Ulrich[2], Stanislav A. Sukhikh[1]

[1] Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

[2] Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Succinic acid is the final metabolite of many microorganisms. It has antioxidant, tonic properties, and also takes part in the metabolic processes of a living organism. Its use in food formulations will help expand the range of functional food products aimed at improving metabolism.

Purpose: Description of methods for obtaining and features of the use of succinic acid in the food industry for the production of functional foods and biologically active food additives.

Materials and Methods: Information search was carried out in the databases Scopus, Web of Science, PubMed, RISC for the period from 01/01/1994 to 03/01/2024. Marketing research reports on the use of succinic acid in the food industry for the period 2016-2023 were also analyzed. The review included review and empirical articles that met the selection criteria in English and Russian. This review of the subject field is based on the PRISMA-ScR protocol.

Results: Currently, succinic acid is produced by chemical or biotechnological methods. The most common method is the chemical method (paraffin oxidation, catalytic hydrogenation, maleic acid or maleic anhydride). There is also a biotechnological method based on the cultivation of microorganisms that produce succinic acid. Various organic substrates, including food industry waste, can be used to cultivate microorganisms. It has been shown that succinic acid is included in the list of safe food additives and is used in food production as an acidity regulator. However, due to the fact that it has proven biological effectiveness, succinic acid can be included in the formulations of various food products, thereby providing them with additional functional properties.

Conclusion: To introduce the biotechnological method into the real sector of the economy, it is necessary to solve a number of limiting factors. It has been established that succinic acid can be used not only as a traditional food additive (acidity regulator), but also as a dietary supplement. The volumes of production and demand for succinic acid are slowly but increasing, which indicates the need to introduce new technologies for the production of succinic acid in order to meet the demand for this product.

Keywords: succinic acid, cell engineering, succinylation, functional foods, food additives, human health

Correspondence:
Babich Olga
E-mail: olich.43@mail.ru

Conflict of interest:
The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 30.11.2023
Revised: 23.05.2024
Accepted: 15.06.2024
Published: 30.06.2024

Founding: The article was carried out with the financial support of the RGNF grant, agreement No. 23-26-00091.

Copyright: © 2024 The Authors

To cite: Babich, O.O., Kalashnikova, O.B., Ulrich, E.V., & Sukhikh, S.A. (2024). Methods for obtaining and using succinic acid in the food industry: A scoping review. *FOOD METAENGINEERING*, *2*(2), 35-47. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.41

ВВЕДЕНИЕ

Янтарная кислота — это дикарбоновая кислота, имеющая широкий спектр применения, в частности, используется в качестве пищевой добавки в продуктах питания (Ahn, 2020). Янтарная кислота в организме оказывает многосторонний терапевтический эффект. Абсолютно доказано ее универсальное антигипоксическое, гепатопротекторное и антистрессовое действие (Степанова & Табаторович, 2010). Установлено адаптогенное действие янтарной кислоты при тяжелых физических нагрузках, имеются данные о стимулирующем действии янтарной кислоты на синтез белка, гемоглобина, усвоение глюкозы и синтез гликогена в печени. Показана важность применения янтарной кислоты в гериатрии и спортивном питании (Коваленко, 2000).

Янтарная кислота и ее соли разрешены для использования в пищевой промышленности для регулирования pH пищевых систем (пищевая добавка E363) (Столярская и соавт., 2021). Учитывая выраженное физиологическое воздействие янтарной кислоты на организм человека, представляется актуальным провести анализ современных исследований по методам получения и продуцентам янтарной кислоты, оценить важность роли янтарной кислоты как биологически активного компонента для получения пищевых продуктов, изучить информацию о расширении спектра ее использования в различных пищевых системах, а также провести оценку текущего состояния рынка янтарной кислоты в России и мире.

Несмотря на значительное количество публикаций о янтарной кислоте в последнее время (Iragavarapu, 2023, Ahn, 2020, Li, 2021, Gao, 2016, Li, 2019), существует много пробелов в изучении использования янтарной кислоты для получения пищевых продуктов.

Целью данного исследования являлось изучение методов получения и особенностей применения янтарной кислоты в пищевой промышленности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол и заявление о прозрачности исследования

Данный обзор предметного поля представляет собой прозрачный, точный и честный отчет о проведенном исследовании с использованием протокола PRISMA.

Критерии отбора

Объектами данного исследования являлись научные публикации российских и зарубежных авторов, касающиеся общих сведений, методов получения и особенностей применение янтарной кислоты в пищевой промышленности. В обзор предметного поля включены экспериментальные, обзорные статьи, доклады конференций, подходящие под критерии отбора. Критерии отбора в соответствии с мнемоникой Выборка, Концепция, Контекст (Population, Concept, Context) представлены в Таблице 1.

Решение о включении или исключении публикации в обзор предметного поля принималось авторами на основе представленных критериев. Дополнительным критерием отбора являлось наличие доступа к полному тексту статьи. В случае отсутствия такого доступа полный текст работы запрашивался у авторов, если авторы работ не предоставляли доступ к тексту, то работа исключалась из обзора.

Стратегия поиска

Для поиска информации были использованы базы данных Scopus, Web of Science, PubMed, РИНЦ за период с начала с 01.01.1994 г по 01.03.2024 г. Отобраны и проанализированы доступные обзорные и экспериментальные статьи по исследуемой тематике на английском и русском языках.

Для поиска информации об использовании янтарной кислоты в пищевой промышленности использовали следующие поисковые запросы: применение янтарной кислоты в пищевой промышленности, использование клеточной инженерии для получения янтарной кислоты, исследование процесса сукцинилирования, янтарная кислота в функциональных продуктах питания, пищевые добавки на основе янтарной кислоты, влияние янтарной кислоты на здоровье человека; the use of succinic acid in the food industry, the use of cell engineering to obtain succinic acid, research on the succinylation process, succinic acid in functional foods, food additives based on succinic acid, the effect of succinic acid on human health.

Процесс отбора

В процессе отбора были исключены источники, не соответствующие критериям отбора. Исключению

Таблица 1

Критерии отбора источников

Критерий	Включено	Исключено	Причины
Популяция	Микроорганизмы, продуцирующие янтарную кислоту	Микроорганизмы, не используемые в пищевой промышленности. Исследования, не затрагивающие развитие микроорганизмов, одним из метаболитов которых является янтарная кислота	Фокус исследования направлен на изучение микроорганизмов, продуцирующих другие метаболиты, или не пищевую янтарную кислоту
Концепция	Исследования, направленные на изучение особенностей роста микроорганизмов, продуцирующих янтарную кислоту. Ресурсы, изучающие рост таких микроорганизмов, или микроорганизмов, входящих в состав консорциума бактерий и грибов, продуцирующих янтарную кислоту	Исследования, направленные на изучение влияния активности микроорганизмов на концентрацию не пищевой янтарной кислоты в готовом продукте. Работы, фокусирующиеся на микроорганизмах, не входящих в состав консорциума, продуцирующего пищевую янтарную кислоту. Исследования, направленные только на изучение питательных сред для разработки продукта	Целью данного исследования является прояснение вопросов о культивировании микроорганизмов для способствования дальнейшим исследованиям по разработке продуктов с использованием янтарной кислоты
Контекст	Исследования, направленные на изучение продуктов пищевой промышленности	Исследования, направленные на изучение продуктов других отраслей. Работы о продуктах, изготовленных на не пищевой янтарной кислоте	Исследование сфокусировано на изучении работ, посвященных продуктам с использованием пищевой янтарной кислоты
Язык	Русский, английский	Все, кроме русского и английского	В связи с наибольшей доступностью статей о получении пищевой янтарной кислоты на русском и английском языках
Временной период	до 01.03.2024	после 01.03.2024	Статьи были ограничены по временному периоду с 1994 года, так как в литературных источниках до 1994 года не обнаруживаются опубликованные обзоры по заданной теме
География	Развитые и бурно развивающиеся страны	Страны со слаборазвитой экономикой, невысоким уровнем жизни	Янтарная кислота используется для производства продуктов функционального и специализированного питания в развитых и развивающихся странах

подвергались и дубли статей. На первом этапе авторы сканировали заглавия. На втором этапе — аннотации. На третьем — реализовывали полно текстовое сканирование. После каждого из этапов нерелевантные источники отсеивались.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты поиска и процесс отбора

Из баз данных Scopus, Web of Science, PubMed, РИНЦ по первичному поисковому запросу были отобраны 246 потенциально приемлемых источника (Рисунок 1). Среди этих публикаций до начала исследований было исключено 16 публикаций: 6 — из-за отсутствия доступа к полному тексту после запроса у авторов, 10 — из-за жанра публикации (препринты не включались в обзор). Далее скринингу было подвергнуто 230 работы, 30 из которых были исключены как дублирующие.

Рисунок 1

Процедура отбора источников для составления обзора предметного поля по PRISMA-ScR

После анализа названий и аннотаций было исключено еще 86 исследований. В ходе дальнейшего скрининга полного текста статей, из 114 оставшейся статьи было исключено еще 57 как не походящих под концепцию и цели данного обзора.

Извлечение и анализ данных

Большинство отобранных публикаций являлись экспериментальными исследованиями, опубликованными в период с 2006 по 2024 год (96,6 % статей было опубликовано в последние 5 лет). Наибольшее количество работ было опубликовано в 2020 году — 37,9 %.

В исследованиях принимали участие авторы из 16 стран. Наиболее активны исследователи из Китая, Южной Америки (Бразилия, Аргентина, Чили) и России. Большинство рассмотренных публикаций написаны на английском языке (91,0 %), на русском (9,0 %).

Методы получения и продуценты янтарной кислоты

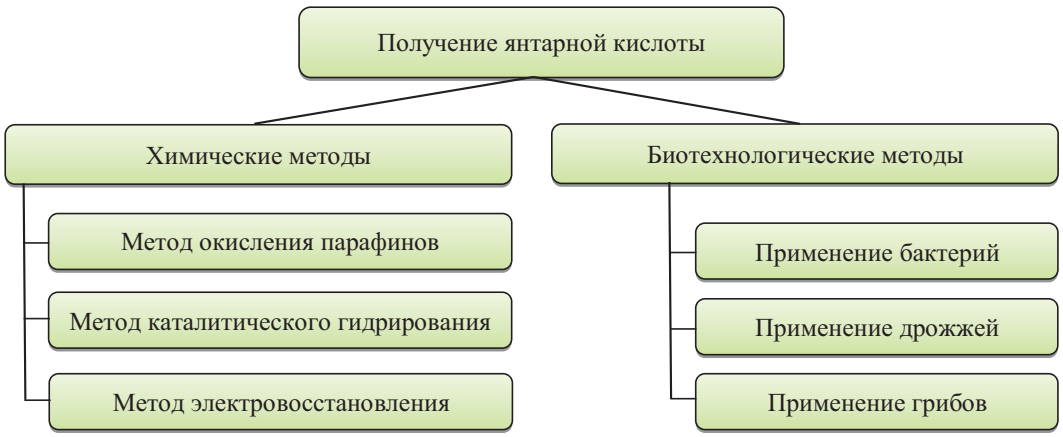
В настоящее время известно два основных способа получения янтарной кислоты и ее производных (Рисунок 2).

Процесс получения янтарной кислоты имеет значительную промышленную значимость, особенно с использованием химических методов. В качестве основного сырья часто применяют нефть и её производные, такие как нефтяное масло и сжиженный нефтяной газ (Song, 2006). Для синтеза янтарной кислоты преимущественно используются методы окисления парафинов (Escanciano, 2022), каталитического гидрирования, а также электровосстановление малеиновой кислоты или малеинового ангидрида (Deng, 2023; Nghiem, 2017). В ходе окисления парафинов применяются катализаторы на основе кальция или марганца, а выделение и очистка продукта осуществляются методами перегонки, кристаллизации и сушки. Однако, как показывают исследования, выход и чистота янтарной кислоты, получаемой данным способом, остаются относительно низкими (Sadare, 2021).

Химические методы получения янтарной кислоты, несмотря на их экономическую эффективность, сталкиваются с рядом ограничений, включая рост цен на нефть и экологические проблемы, связанные с нефтяным производством (Song, 2006; Nghiem, 2017). Это стимулирует исследования альтернативных методов, в частности биотехнологического производства янтарной кислоты. Биотехнологический метод включает культивирование микроорганизмов, таких как Actinobacillus succinogenes, которые способны накапливать янтарную кислоту в условиях анаэробной ферментации (Thuy, 2017; Liu, 2022a; Liu, 2022b). Культуры A. succinogenes можно выращивать в средах, обогащенных различными органическими субстратами, включая молочную сыворотку, тростниковую мелассу и аграрные отходы, что демонстрирует их потенциал для использования широкого спектра углеродных источников (Wan, 2008; Zheng, 2009; Li, 2010).

Рисунок 2

Методы получения янтарной кислоты



Примечание. Deng, 2023; Nghiem, 2017; Thuy, 2017; Carvalho, 2016; Contreras-Ruiz, 2023; Show, 2015.

Технология мембранно-биореакторного процесса с последующим электродиализом, разработанная Kumar и соавторами (2020), позволяет получить высококонцентрированный раствор сукцината натрия с высоким выходом, что подчеркивает экономическую привлекательность этого метода. Также было исследовано использование Corynebacterium crenatum для производства янтарной кислоты в минеральной среде в анаэробных условиях (Chen, 2023).

Научные разработки также акцентируют внимание на использовании грибков и дрожжей, таких как Aspergillus niger и Saccharomyces cerevisiae, которые могут производить янтарную кислоту как побочный продукт метаболизма (Sadare, 2021; Contreras-Ruiz, 2023; Matthews, 2019; Escanciano, 2022). Прогресс в биотехнологических методах получения янтарной кислоты, несмотря на свои потенциальные экологические и экономические преимущества, сталкивается с ограничениями, связанными с сложностью процессов и высокими затратами на производство и очистку продукта. Возможное решение этих проблем предполагает разработку новых стратегий, направленных на смягчение ограничений, включая поиск новых микроорганизмов и генетическую модификацию существующих продуцентов (Mitrea, 2024).

Янтарная кислота как биоактивный ингредиент в пищевой промышленности

Янтарная кислота, включённая в список безопасных пищевых добавок в Европе и России, используется в рецептурах разнообразных пищевых продуктов, придавая им дополнительные функциональные свойства (Alexandri, 2022). Известно, что янтарная кислота обладает многочисленными терапевтическими эффектами. В частности, Lieshchova (2020) подтверждает, что янтарная кислота проявляет антигипоксическое, гепатотропное, антистрессовое действие, а также способствует адаптации организма при интенсивных физических нагрузках. Tosato (2022) установил, что янтарная кислота стимулирует синтез белка, гемоглобина и гликогена в печени, а также участвует в метаболизме глюкозы, проявляя инсулинотропный эффект на моделях сахарного диабета. Принимается во внимание также алкопротекторный эффект янтарной кислоты (Prabhu, 2020).

Янтарная кислота играет важную роль в энергообразующих процессах клетки, способствует утилизации кислорода и активации окислительно-восстановительных ферментных систем (He, 2021). Она оказывает положительное воздействие на процессы кровеобразования, функционирование сердца и мозга, а также активирует метаболические процессы в центральной нервной системе (Sapozhnikova, 2022).

В пищевой промышленности янтарная кислота применяется как регулятор кислотности в производстве майонеза, соусов, десертов, суповых концентратов, а также в алкогольных и безалкогольных напитках (Prabhu, 2020). Сукцинат натрия используется как усилитель вкуса, предлагая альтернативу глутамату натрия, в то время как дилизинсукцинат служит усилителем солёного вкуса для продуктов с низким содержанием натрия (Yin, 2024). Примеры использования и роль янтарной кислоты подробно представлены в Таблица 2.

Абсолютная безвредность янтарной кислоты и ее солей, ее способность оказывать положительный эффект даже при весьма низких дозировках (10 мг/кг) делают ее весь-

Таблица 2

Критерии отбора источников

Группа продуктов	Функциональное назначение
Алкогольные напитки	Антитоксическое воздействие, снижение абстинентного синдрома (БАД Янталак ГФ)
Майонезы, сухие напитки, супы, десерты, водка, пиво, вино, карамель, жевательная резинка	Регулятор кислотности и консервант
Изотонические напитки	Предотвращение обезвоживания, оптимизация водно-солевого баланса в организме человека
Напитки функционального назначения при вредных условиях труда	В качестве антидота (Выведение солей мышьяка, ртути, свинца, аммиака, нитратов и нитритов, токсинов)
Маргарин «Тонус 1»	Антиокислитель
Мармелад	Вкусовая и обогащающая добавка
Дрожжи прессованные хлебопекарные	Активация дрожжей, сокращение времени брожения

Примечание. Составлено по Косинец, 2012; Prabhu, 2020

ма ценным компонентом при разработке нового поколения, так называемых «умных» лекарств, пищевых добавок (Косинец, 2012).

Текущее состояние рынка янтарной кислоты

Текущий объем мирового рынка янтарной кислоты остаётся относительно скромным, однако химически синтезированная янтарная кислота продолжает доминировать по сравнению с её биологическими аналогами. Это обусловлено, в первую очередь, меньшими финансовыми и капитальными затратами на её производство, стабильностью поставок сырья и регулярностью выпуска продукции. Согласно исследованию Mitrea (2024), рынок янтарной кислоты в 2021 году достиг 117,20 миллионов долларов США, а к 2022 году вырос до 171,34 миллиона долларов США. Предвидится, что к 2030 году рынок достигнет прибыльности в размере 272,4 миллиона долларов США, что отражает умеренные темпы роста.

По прогнозам, значительная доля химических веществ мирового спроса к 2025 году будет производиться из биологических источников, превышая 15 % (Narisetty, 2022). Ожидается, что к 2025 году мировой рынок янтарной кислоты увеличится на 27,4 % и достигнет объёма в 1,8 миллиарда долларов, что соответствует 768 миллионам тонн по цене 2,3 доллара за кг (Nghiem, 2017).

Рынок янтарной кислоты характеризуется высокой степенью конкуренции, обусловленной активной деятельностью транснациональных компаний (Таблица 3). Эти компании постоянно инвестируют в модернизацию производства и ведут активную научно-исследовательскую и опытно-конструкторскую работу для улучшения технологий производства янтарной кислоты (Magalhães, 2021; Narisetty, 2022; Guo, 2022). Это подчёркивает стратегическую важность инноваций и улучшения производственных процессов в условиях ожесточённой конкуренции на мировом рынке.

Анализ аналитических данных позволил выявить, что основными странами производителями янтарной кислоты являются США, Мексика, Канада, Германия, Франция, Италия, Испания, Китай. Также наблюдается производство янтарной кислоты в таких странах как Турция, Саудовская Аравия, Бразилия, Аргентина, Индия, Австралия (Cok, 2014)1. Соласно данным Таблице 3, страны Европы являются лидерами по производству янтарной кислоты.

В 2017 году объем рынка янтарной кислоты в России составил 332,54 тонны, а в 2018 году достиг значения 392,8 тонны, что на 4,2 % ниже объема рынка янтарной кислоты 2016 года. Объем рынка в 2020 году составил 405,60 тонн. Отмечено, что в 2023 году данный показатель незначительно снизился (Рисунок 3). В денежном эквиваленте Российский рынок янтарной кислоты в 2017 г достиг значения 937,62 тыс. долларов США, а в 2018 г превысил значения 1166,01 тыс. долларов США

Таблица 3

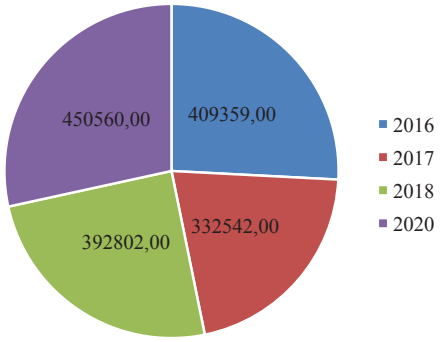
Основные производителя янтарной кислоты

Наименование компании	Страна
BioAmber, Mitsui	Канада
Reverdia	Италия
BASF, Purac	Испания
Kemira	Китай
HUGESTONE ENTERPRISE CO. LTD	Китай
PTT Public	Таиланд
Company Limited (Myriant)	США
Mitsubishi Chemical Corporation	Япония
LCY Biosciences	Канада

Примечание. Составлено по Magalhães, 2021; Narisetty, 2022; Guo, 2022.[1]

Рисунок 3

Объем рынка янтарной кислоты в России



Примечание. Из Cok, 2014 [2]

[1] Succinic Acid Market by Type (Bio-based Succinic Acid, Petroleum-based Succinic Acid), End-Use Industry (Industrial, Food & Beverage, Coatings, Pharmaceutical) and by Region (North America, Europe, Asia Pacific, South America, Middle East and Africa) Global trends and forecasts from 2023 to 2029. Exactitude consultancy. https://exactitudeconsultancy.com/ru/reports/19185/succinic-acid-market/

[2] Succinic Acid Market by Type (Bio-based Succinic Acid, Petroleum-based Succinic Acid), End-Use Industry (Industrial, Food & Beverage, Coatings, Pharmaceutical) and by Region (North America, Europe, Asia Pacific, South America, Middle East and Africa) Global trends and forecasts from 2023 to 2029. Exactitude consultancy. https://exactitudeconsultancy.com/ru/reports/19185/succinic-acid-market/

Российский рынок янтарной кислоты преимущественно состоит из импорта. В 2017 г. на импорт пришлось 97,2 % от всего объема отечественного рынка, при этом в 2017 году производство янтарной кислоты в России составило всего 10 025,8 кг, что в денежном эквиваленте составило 209,31 тыс. долларов США. В 2018 году объем производства янтарной кислоты в России составил 216,43 тыс. долларов США. Объем производства объекта изучения в 2020 году отечественными производителями составил 65,22 тыс. долларов США[1], при этом импорт янтарной кислоты в 14,7 раз превысил объем отечественного производства и составил 955,05 тыс. долларов США. По данным открытых источников лидером по импорту янтарной кислоты в Россию является Китай, который поставил ее в Россию в количестве 322 853 кг (41,0 % от общего объема импорта).

В ходе исследования установлено, что основными производителями янтарной кислоты в России являются ОАО «МАРБИОФАРМ» (г. Йошкар-Ола, Россия), АО «ХИМРЕАКТИВСНАБ» (г. Уфа, Россия), ООО «Полисинтез» (Белгород, Россия). Выявлено, что АО «Калининградский янтарный комбинат» наладил производство янтарной кислоты. В открытых источниках указано, что комбинат производит ее в количестве не более 200 кг в месяц (с учетом очистки ее в г. Санкт-Петербурге, Россия)[2].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе данного исследования удалось достичь основной цели, определённой авторами: были изучены методы получения янтарной кислоты и особенности её применения в пищевой промышленности, а также выполнен анализ рынка янтарной кислоты в России и мире. Особое внимание уделено малоизученным аспектам, таким как развитие биотехнологических методов получения янтарной кислоты, которые традиционно оставались в тени химических методов, включая омыление динитрилов и окисление окси- и оксокислот, синтез сукцинатов из малоновой кислот, а также синтез симметрично замещённой янтарной кислоты и её эфиров через взаимодействие α-карбанионов (Зорин и соавт., 2016; Зорин, 2015).

На основании анализа литературных источников было установлено, что биотехнологические методы на сегодняшний день выходят на передний план. Это объясняется преимуществами биотехнологических процессов, которые осуществляются в более мягких условиях — при нормальном давлении и невысоких температурах, что приводит к меньшему загрязнению окружающей среды по сравнению с химическими методами (Mitrea et al., 2024; Liu et al., 2021; Li et al., 2021).

Современные исследования подтверждают, что бактерии, плесневые грибы и дрожжи способны эффективно синтезировать янтарную кислоту, что находит отражение в работах ведущих ученых (Liu et al., 2022; Gonzales et al., 2020). Наши результаты подтверждают, что идеальный биопродуцент должен быть способен использовать разнообразные источники углерода и быть устойчивым к высокому осмотическому давлению, при этом не выделяя побочных продуктов. Одной из ключевых характеристик продуцента является концентрация синтезируемой кислоты в культуральной жидкости. Применение современных технологий генной инженерии открывает возможности для создания новых штаммов микроорганизмов и дрожжей с нужными характеристиками (Louasté and Eloutassi, 2020; Grimolizzi and Arranz, 2018; Wahl et al., 2017).

Исследуются и возможности использования янтарной кислоты в пищевой промышленности. Например, Романовым (2017) была усовершенствована рецептура мармелада путём добавления янтарной кислоты, что сделало продукт функциональным и полезным для адаптации и профилактики стрессов (Комаров, 2021; Табаторович, 2019). Исследования Столярской и соавт. (2021) показали возможности использования янтарной кислоты в соковой продукции.

Таким образом, янтарная кислота может быть использована не только как традиционная пищевая добавка, но и как биологически активная добавка, способствующая созданию новых продуктов питания функционального и специализированного назначения. Однако, исследование также выявило ограничения, связанные с преобладанием на российском рынке импортной продукции. Медленное увеличение объёмов производства и спроса на янтарную кислоту свидетельствует о необходимости внедрения новых технологий для удовлетворения растущего спроса. Планируется дальнейшее изу-

[1] Анализ рынка кислоты янтарной в России (с базой импорта-экспорта). https://drgroup.ru/2388-analiz-rynka-yantarnoj-kisloty-v-Rossii.html)

[2] Анализ рынка янтарной кислоты в России. https://marketpublishers.ru/report/industry/chemicals_petrochemicals/analiz-rinka-yantarnoy-kisloti-v-rossii.html

чение и внедрение технологий для повышения выхода и ускорения процесса производства, с использованием экологически чистых «микробиофабрик». Стандартизация биотехнологической янтарной кислоты необходима для обеспечения стабильности её терапевтических свойств (Mitrea et al., 2024).

В конечном итоге, глобальный рынок янтарной кислоты, хотя и не характеризуется значительными объемами, демонстрирует высокую конкурентоспособность, что обусловлено активностью крупных транснациональных компаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Янтарная кислота, являясь органической кислотой, обладает значительным промышленным потенциалом, однако исследования в области безопасных методов её получения и применения в пищевых продуктах остаются недостаточными. Традиционно янтарная кислота производится на промышленных масштабах химическим способом из продуктов переработки нефти. Однако экологические ограничения, связанные с использованием нефтехимических процессов, ставят перед наукой задачу поиска альтернативных способов её синтеза. Биотехнологический метод получения представляется перспективным вариантом благодаря своей легкости в масштабировании и экологичности.

В пищевой промышленности янтарная кислота традиционно используется как регулятор кислотности в производстве майонезов, соусов, десертов, суповых концентратов, а также в алкогольных и безалкогольных напитках. Однако научные данные свидетельствуют о благоприятных биологических эффектах янтарной кислоты, что расширяет перспективы её применения для создания функциональных и специализированных пищевых продуктов.

Данные текущего обзора свидетельствуют о необходимости разработки инновационных стратегий производства янтарной кислоты на биологической основе. Такой подход позволит сделать процесс не только экологически устойчивым, но и технически, а также экономически эффективным. Последующие исследования должны сосредоточиться на разработке и оптимизации биотехнологических методов производства, а также на изучении новых областей применения янтарной кислоты в пищевой индустрии.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Бабич Ольга Олеговна: создание рукописи и сё редактирование, администрирование проекта.

Калашникова Ольга Борисовна: формальный анализ.

Ульрих Елена Викторовна: методология, создание черновика рукописи.

Сухих Станислав Алексеевич: концептуализация, создание черновика рукописи, создание рукописи иеё редактирование, администрирование проекта.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Зорин, А.В., Зайнашев, А.Т., Чанышева, А.Р., & Зорин, В.В. (2015). Взаимодействие α-карбанионов ацилатов лития с 1,2-дибромэтаном. *Журнал органической химии*, *85*(6), 914–917.

Zorin, A.V., Zaynashev, A.T., Chanysheva, A.R., & Zorin, V.V. (2015). Interaction of α-carbanions of lithium acylates with 1,2-dibromoethane. *Journal of Organic Chemistry, 85*(6), 914-917. (In Russ.)

Зорин, А.В., Чанышева, А.Р., & Зорин, В.В. (2016). Синтез янтарной кислоты и ее замещенных производных в реакциях αкарбанионов ацилатов с хлорацетатом натрия. *Известия вузов. Химия и химическая технология*, *59*(10), 19–23. https://doi.org/10.6060/tcct.20165910.5399

Zorin, A.V., Chanysheva, A.R., & Zorin, V.V. (2016). Synthesis of succinic acid and its substituted derivatives in reactions of α-carbanions of acylates with sodium chloroacetate. *ChemChemTech, 59*(10), 19-23. (In Russ.) https://doi.org/10.6060/tcct.20165910.5399

Коваленко, А.Л., & Белякова, Н.В. (2000). Янтарная кислота: фармакологическая активность и лекарственные формы. *Фармация, 5–6*, 40–43.

Kovalenko, A.L., & Belyakova, N.V. (2000). Succinic acid: pharmacological activity and dosage forms. *Pharmacy, 5-6,* 40-43. (In Russ.)

Комаров, А. А., Енгашев, С. В., Енгашева, Е. С., Удавлиев, Д. И., Егоров, М. А., Уша, Б. В., Селимов, Р. Н., & Гламаздин, И. Г. (2021). Амоксициллин и янтарная кислота: Эффективные лекарственные средства для защиты здоровья животных (обзор). *Хранение и переработка сельхозсырья,* 4, 98–117. https://doi.org/10.36107/spfp.2021.259

Komarov, A. A., Engashev, S. V., Engasheva, E. S., Udavliev, D. I., Egorov, M. A., Usha, B. V., Selimov, R. N., & Glamazdin, I. G. (2021). Amoxicillin and succinic acid: Effective medicines for animal health protection (review). *Storage and Processing of Agricultural Raw Materials, 4*, 98-117. (In Russ.) https://doi.org/10.36107/spfp.2021.259

Косинец, В. А., Столбицкий, В. В., & Штурич, И. П. (2012). Опыт применения цитофлавина в спортивном питании. *Клиническая медицина*, *90*(7), 56–59.

Kosinets, V. A., Stolbitsky, V. V., & Shturich, I. P. (2012). Experience of using cytoflavin in sports nutrition. *Clinical Medicine, 90*(7), 56-59. (In Russ.)

Романова, Н. К. (2017). Сукцинаты - перспективные добавки в технологиях продуктов из растительного сырья. *Вестник Казанского технологического университета, 20*(16), 128-132.

Romanova, N. K. (2017). Succinates - promising additives in the technologies of products from plant raw materials. *Herald of Technological University, 20*(16), 128-132. (In Russ.)

Сапожникова, Т. В., Сапожников, К. В., Парфенов, С. А., Елькин, А. А., Ризаханов, Д. М., & Ризаханова, О. А. (2022). Вегетативный и психический статус пациентов с функциональными заболеваниями ЖКТ. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 198*(2), 159–168. https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-198-2-159-168

Sapozhnikova, T. V., Sapozhnikov, K. V., Parfenov, S. A., Elkin, A. A., Rizakhanov, D. M., & Rizakhanova, O. A. (2022). Vegetative and mental status of patients with functional gastrointestinal diseases. *Experimental & Clinical Gastroenterology Journal*, *198*(2), 159-168. (In Russ.) https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-198-2-159-168

Степанова, Е.Н., & Табаторович, А.Н. (2010). Возможность использования янтарной кислоты в технологии производства мармелада. *Техника и технология пищевых производств, 17*(2), 1–6.

Stepanova, E.N., & Tabatorovich, A.N. (2010). Possibility of using succinic acid in the technology of marmalade production. *Food Processing: Techniques and Technology, 17*(2), 1-6. (In Russ.)

Столярская, Е.А., Соклаков, В.В., & Воротников, Б.Ю. (2021). Использование янтарной кислоты при производстве обогащённой соковой продукции из фруктов. *Вестник молодежной науки*, 2(29), 14.

Stolyarskaya, E.A., Soklakov, V.V., & Vorotnikov, B.Yu. (2021). The use of succinic acid in the production of enriched fruit juice products. *Bulletin of Youth Science, 2*(29), 14. (In Russ.)

Табаторович, А. Н. & Резниченко И. Ю. (2019). Разработка и оценка качества диабетического желейного мармелада «Каркаде», обогащенного янтарной кислотой. *Food Processing: Techniques and Technolog, 49*(2), 320–329. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2019-2-320-329

Ahn, J. H., Seo, H., Park, W., Seok, J., Lee, J. A., Kim, W. J., Kim, G. B., Kim, K.J., & Lee, S. Y. (2020). Enhanced succinic acid production by Mannheimia employing optimal malate dehydrogenase. *Nature Communications*, *11*(1), 1970. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15839-z

Alexandri, M., Kachrimanidou, V., Papapostolou, H., Papadaki, A., & Kopsahelis, N. (2022). Sustainable food systems: The case of functional compounds towards the development of clean label food products. *Foods, 11*, 2796. https://doi.org/10.3390/foods11182796

Carvalho, M., Roca, C., & Reis, M. A. (2016). Improving succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from raw industrial carob pods. *Bioresource Technology, 218*, 491–497. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.140

Chen, C., & Zheng, P. (2023). New insights into the biosynthesis of succinic acid by actinobacillus succinogenes with the help of its engineered strains. *Fermentation, 9*(12), 1026. https://doi.org/10.3390/fermentation9121026

Cok, B., Tsiropoulos, I., Roes, A. L., & Patel, M. K. (2014). Succinic acid production derived from carbohydrates: An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *8*(1), 16–29.

Contreras-Ruiz, A., Alonso-del-Real, J., Barrio, E., & Querol, A. (2023). Saccharomyces cerevisiae wine strains show a wide range of competitive abilities and differential nutrient uptake behavior in co-culture with *S. kudriavzevii*. *Food Microbiology, 114*, 104276. https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104276

Deng, W., Feng Y., Fu J., Guo H., Guo Y., Han B., Jiang Z., Kong L., Li C., Liu H., Nguyen P. T. T., Ren P., Wang F., Wang S., Wang Y., Wang Y., Wong S. S., Yan K., Yan N., Yang X., Zhang Y., Zhang Z., Zeng X. & Zhou H. (2023). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels. *Green Energy & Environment, 8*, 1. https://doi.org/10.1016/j.gee.2022.07.003.

Escanciano, I. A., Wojtusik, M., Esteban, J., Ladero, M., & Santos, V. E. (2022). Modeling the succinic acid bioprocess: A review. *Fermentation*, *8*(8), 368. https://doi.org/10.3390/fermentation8080368

Gao, C., Yang, X., & Wang, H. (2016). Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Biofuels, 9*, 179. https://doi.org/10.1186/s13068–016-0597–8

Gonzales, T.A., de Carvalho Silvello, M.A., Duarte, E.R., Santos, L.O., Alegre, R.M., & Goldbeck, R. (2020). Optimization of anaerobic fermentation of Actinobacillus succinogenes for increase the succinic acid production. *Biocatalysis and agricultural biotechnology, 27*, 101718.

Grimolizzi, F., & Arranz, L. (2018). Multiple faces of succinate beyond metabolism in blood. *Haematologica*, *103*(10), 1586.

Guo, F., Wu, M., Zhang, S., Feng, Y., Jiang, Y., Jiang, W., Xin, F., Zhang, W. & Jiang, M. (2022). Improved succinic acid production through the reconstruction of methanol dissimilation in *Escherichia coli*. *Bioresources and Bioprocessing, 9*(1), 62. https://doi.org/10.1186/s40643-022-00547-x

He, Y., Huang, W., Zhang, C., Chen, L., Xu, R., Li, N., Wang, F., Li, H., Yang, M., & Zhang, D. (2021). Energy metabolism disorders and potential therapeutic drugs in heart failure. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *11*(5), 1098–1116. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.007

Iragavarapu, G. P., Imam, S. S., Sarkar, O., Mohan, S. V., Chang, Y. C., Reddy, M. V., Kim, S. H., Amradi, N. K., & Amradi, N. K. (2023). Bioprocessing of Waste for Renewable Chemicals and Fuels to Promote Bioeconomy. *Energies*, *16*(9), 3873. https://doi.org/10.3390/en16093873

Júnior, A. I. M., Soccol, C. R., Camara, M. C., Aulestia, D. T. M., de Souza Vandenberghe, L. P., & de Carvalho, J. C. (2021). Challenges in the production of second-generation organic acids (potential monomers for application in biopolymers). *Biomass and Bioenergy*, *149,* 106092. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106092

Kumar, R., Basak, B., & Jeon, B. H. (2020). Sustainable production and purification of succinic acid: A review of membrane-integrated green approach. *Journal of Cleaner Production, 277*, 123954. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123954

Li, C., Ong, K. L., Cui, Z., Sang, Z., Li, X., Patria, R. D., & Lin, C. S. K. (2021). Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts. *Journal of Hazardous Materials*, *401*, 123414.

Li, C., Ong, K. L., Cui, Z., Sang, Z., Li, X., Patria, R. D., Qi, Q., Fickers, P., Yan, J., & Lin, C. S. K. (2021). Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts. *Journal of Hazardous Materials, 401*, 123414. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123414

Li, C., Ong, K. L., Cui, Z., Sang, Z., Li, X., Patria, R. D., Qi, Q., Fickers, P., Yan, J., Lin, & C. S. K. (2021). Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts. *Journal of Hazardous Materials, 401*, 123414. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123414

Li, C., Ong, K. L., Yang, X., & Lin, C. S. K. (2019). Bio-refinery of waste streams for green and efficient succinic acid production by engineered Yarrowia lipolytica without pH control. *Chemical Engineering Journal, 371,* 804–812. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.092

Li, Q., Siles, J.A. & Thompson, I.P. (2010). Succinic acid production from orange peel and wheat straw by batch fermentations of *Fibrobacter succinogenes S85*. *Applied Microbiology and Biotechnology, 88*, 671–678. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2726-9

Lieshchova, M. A., Bilan, M. V., Bohomaz, A. A., Tishkina, N. M., & Brygadyrenko V. V. (2020). Effect of succinic acid on the organism of mice and their intestinal microbiota against the background of excessive fat consumption. *Regulatory Mechanisms in Biosystems, 11*(2), 153–161. https://doi.org/10.15421/022023

Liu, H., Song, Y., Fan, X., Wang, C., Lu, X., & Tian, Y. (2021). Yarrowia lipolytica as an oleaginous platform for the production of value-added fatty acid-based bioproducts. *Frontiers in Microbiology,* 11, 608662.

Liu, J., Liu, J., Guo, L., Liu, J., Chen, X., Liu, L., & Gao, C. (2022). Advances in microbial synthesis of bioplastic monomers. In *Advances in Applied Microbiology* (vol. 119, pp. 35–81). *Academic Press.* https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2022.05.002.

Liu, X., Zhao, G., Sun, S., Fan, C., Feng, X., & Xiong, P. (2022). Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10*, 843887. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.843887

Liu, X., Zhao, G., Sun, S., Fan, C., Feng, X., & Xiong, P. (2022). Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10,* 843887.

Louasté, B., & Eloutassi, N. (2020). Succinic acid production from whey and lactose by Actinobacillus succinogenes 130Z in batch fermentation. *Biotechnology Reports, 27*, e00481.

Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2019). The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*, *10*(2), 115–132. https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1505176

Mitrea, L., Teleky, B. E., Nemes, S. A., Plamada, D., Varvara, R. A., Pascuta, M. S., Ciont, C., Cocean, A., Medeleanu, M., Nistor, A., Rotar A., Pop, C. R., & Vodnar, D. C. (2024). Succinic acid–A run-through of the latest perspectives of production from renewable biomass. *Heliyon*. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25551

Mitrea, L., Teleky, B.-E., Nemes, S.-A., Plamada D., Varvara, R.-A., Pascuta, M.-S., Ciont, C., Cocean, A.-M., Medeleanu, M., Nistor, A., Rotar, A.-M., Pop, C.-R., & Vodnar, D.-C. (2024). Succinic acid — A run-through of the latest perspectives of production from renewable biomass. *Heliyon,* 10(3), e25551. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25551

Narisetty, V., Okibe, M. C., Amulya, K., Jokodola, E. O., Coulon, F., Tyagi, V. K., Lens, P. N. L., Parameswaran, B., & Kumar, V. (2022). Technological advancements in valorization of second generation (2G) feedstocks for bio-based succinic acid production. *Bioresource technology, 360*, 127513. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127513

Nghiem, N. P., Kleff, S., & Schwegmann, S. (2017). Succinic acid: technology development and commercialization. *Fermentation, 3*(2), 26. https://doi.org/10.3390/fermentation3020026

Omwene, P. I., Yağcıoğlu, M., Öcal-Sarihan, Z. B., Ertan, F., Keris-Sen, Ü. D., Karagunduz, A., & Keskinler, B. (2021). Batch fermentation of succinic acid from cheese whey by Actinobacillus succinogenes under variant medium composition. *3 Biotech, 11*(8), 389. https://doi.org/10.1007/s13205–021-02939-w

Perez-Zabaleta, M. (2019). *Metabolic engineering and cultivation strategies for recombinant production of (R)-3-hydroxybutyrate* [Unpublished doctoral dissertation]. KTH Royal Institute of Technology.

Prabhu, A. A., Ledesma-Amaro, R., Lin, C. S. K., Coulon, F., Thakur V. K., & Kumar, V. (2020). Bioproduction of succinic acid from xylose by engineered Yarrowia lipolytica without pH control. *Biotechnol Biofuels, 13*, 113. https://doi.org/10.1186/s13068–020-01747–3

Sadare, O. O., Ejekwu, O., Moshokoa, M. F., Jimoh, M. O., & Daramola, M. O. (2021). Membrane purification techniques for recovery of succinic acid obtained from fermentation broth during bioconversion of lignocellulosic biomass: Current advances and future perspectives. *Sustainability*, *13*(12), 6794. https://doi.org/10.3390/su13126794

Salma, A., Djelal, H., Abdallah, R., Fourcade, F., & Amrane, A. (2021). Platform molecule from sustainable raw materials; case study succinic acid. *Brazilian Journal of Chemical Engineering, 38*(2), 215–239. ff10.1007/s43153-021-00103-8ff

Shi, Y., Pu, D., Zhou, X., & Zhang, Y. (2022). Recent progress in the study of taste characteristics and the nutrition and health properties of organic acids in foods. *Foods, 11*(21), 3408. https://doi.org/10.3390/foods11213408

Show, P. L., Oladele, K. O., Siew, Q. Y., Zakry, F. A. A., Lan, J. C.-W., & Ling, T. C. (2015). Overview of citric acid production from Aspergillus niger. *Frontiers in Life Science*, *8*(3), 271–283, https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653

Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology, 39*(3), 352–361. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.043

Thuy, N. T. H., Kongkaew, A., Flood, A., & Boontawan, A. (2017). Fermentation and crystallization of succinic acid from Actinobacillus succinogenes ATCC55618 using fresh cassava root as the main substrate. *Bioresource Technology, 233*, 342–352. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.114

Tosato, M., Ciciarello, F., Zazzara, M. B., Pais, C., Savera, G., Picca, A., Galluzzo, V., Coelho-Júnior, H. J., Calvani, R., Marzetti, E., Landi, F., & Gemelli A. (2022). Covid-19 post-acute care team. nutraceuticals and dietary supplements for older adults with long Covid-19. *Clinics in Geriatric Medicine, 38*(3), 565–591. https://doi.org/10.1016/j.cger.2022.04.004

Upton, D. J., McQueen-Mason, S. J., & Wood, A. J. (2017). An accurate description of Aspergillus Niger organic acid batch fermentation through dynamic metabolic modelling. *Biotechnology for Biofuels, 10*, 258. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0950-6

Wahl, S. A., Bernal Martinez, C., Zhao, Z., van Gulik, W. M., & Jansen, M. L. (2017). Intracellular product recycling in high succinic acid producing yeast at low pH. *Microbial Cell Factories*, *16*, 1–13.

Wan, C., Li, Y., Shahbazi, A., & Xiu, S. (2008). Succinic acid production from cheese whey using Actinobacillus succinogenes 130 Z. In B*iotechnology for fuels and chemicals:*

proceedings of the twenty-ninth symposium on biotechnology for fuels and chemicals (pp. 111–119). Humana Press.

Yin, G., Sun, Z., Wang, Z., Xia, Y., Cheng, L., Qin, G., Aschalew, N. D., Liu, H., Zhang, X., Wu, Q., Zhang, W., Zhao, W., Wang, T., & Zhen, Y. (2024). Mechanistic insights into inositol-mediated rumen function promotion and metabolic alteration using in vitro and in vivo models. *Frontiers in Veterinary Science, 11*, 1359234. https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1359234

Zheng, P., Dong, J. J., Sun, Z. H., Ni, Y., & Fang, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by Actinobacillus succinogenes. *Bioresource Technology, 100*(8), 2425–2429. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.043

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.46

Использование рекомбинантных белков в современной пищевой биотехнологии: обзор предметного поля

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: С 1994 года динамичное развитие биотехнологии и широкое применение рекомбинантных ферментов привели к новым технологическим решениям в пищевом производстве. Современные технологии позволяют производить сахар, хлеб, пиво, сыр, колбасы и другие продукты с использованием биотехнологических процессов и промышленных пищевых ферментов. Биопродукция рекомбинантных белков заменила природные ферменты, предоставляя ферменты с улучшенными каталитическими функциями, стабильностью и расширенным диапазоном условий функционирования. Использование этих ферментов оказались экономически выгоднее по сравнению с природными и ранее использовавшимися рекомбинантными ферментами.

Цель: Выявить границы предметного поля по исследованию рекомбинантных белков и их роли в современном пищевом производстве за период с 1973 по 2024 гг.

Материалы и методы: Поиск источников осуществляли в базах данных PubMed, РИНЦ и Google Scholar. Методология обзора опиралась на протокол PRISMA-ScR. Хронологические рамки обзора: с 1973 по 2024 г.

Результаты: Первоначальный поиск по ключевым словам позволил выявить 121 источник: 101 в базах данных и 20 из других источников. После удаления дубликатов осталось 113 источников. Оценено 111 полнотекстовых публикаций на приемлемость, в качестве неприемлемых исключены две публикации. Согласно основному массиву исследований, заметна тенденция к использованию модифицированных по физико-химическим и каталитическим свойствам рекомбинантных ферментов. Наблюдается тенденция к увеличению частотности использования рекомбинантных белков, продуцированных методами прецизионной ферментации. Приведены общие сведения о применении рекомбинантных белков в пищевой промышленности. Показана роль рекомбинантных белков в современной пищевой промышленности.

Выводы: Развитие молекулярной биотехнологии позволило создать новые ферменты и белки для нужд пищевой промышленности, расширив их использование в сыроделии, кондитерском производстве и хлебопечении. Существуют вызовы в разработке новых ферментов, экспрессионных систем для биопродукции и биопроцессов с принципиально новыми характеристиками, что приводит к большей экономической целесообразности. Анализ выявил вызовы, связанные с необходимостью соответствия нормативно-правовых актов текущим возможностям и тенденциям в области биопродукции рекомбинантных белков для пищевой промышленности. Полученные результаты могут быть использованы для улучшения каталитических особенностей рекомбинантных ферментов и повышения стабильности ферментных препаратов. Эти результаты полезны для направленной разработки систем продукции рекомбинантных белков и ферментов, увеличения их продуктивности за счет лучшего понимания основных направлений современной индустрии рекомбинантных ферментов для пищевого производства.

Ключевые слова: ферменты, рекомбинантные белки, штаммы-продуценты, регулирование рекомбинантных ферментов, генно-модифицированные организмы, ГМ-продукты, биотехнологии промышленного синтеза белков, биоинженерия белков, генетически-модифицированные источники пищи.

Корреспонденция:

Филькин Сергей Юрьевич
E-mail: s.filkin@fbras.ru

Конфликт интересов:
авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 03.10.2023
Доработана: 30.05.2024
Принята: 15.06.2024
Опубликована: 30.06.2024

Copyright: © 2024 Авторы

Для цитирования: Филькин, С.Ю., Липкин ,А.В., & Федоров, А.Н. (2024). Использование рекомбинантных белков в современной пищевой биотехнологии: обзор предметного поля. *FOOD METAENGINEERING, 2*(2), 48-74. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.46

REVIEW

https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.46

Application of Omics Methods in the Study of Endophytic Microorganisms: A Scoping Review

Sergey Yu. Filkin, Alexey V. Lipkin, Alexey N. Fedorov

The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Since 1994, the dynamic development of biotechnology and the widespread application of recombinant enzymes have led to new technological solutions in food production. Modern technologies enable the production of sugar, bread, beer, cheese, sausages, and other products using biotechnological processes and industrial food enzymes. The bioproduction of recombinant proteins has replaced natural enzymes, offering enzymes with enhanced catalytic functions, stability, and an extended range of operating conditions. These recombinant enzymes have proven to be economically more advantageous compared to natural and previously used recombinant enzymes.

Purpose: To delineate the scope of research on recombinant proteins and their role in modern food production from 1973 to 2024.

Materials and Methods: Sources were searched in the databases PubMed, RSCI, and Google Scholar. The review methodology adhered to the PRISMA-ScR protocol. The chronological scope of the review spans from 1973 to 2024.

Results: The initial search with keywords identified 121 sources: 101 from databases and 20 from other sources. After removing duplicates, 113 sources remained. A total of 111 full-text publications were assessed for eligibility, with two full publications excluded as ineligible. The main body of research indicates a trend towards the use of recombinant enzymes modified for improved physicochemical and catalytic properties. There is a noticeable trend towards the more widespread use of recombinant proteins produced by precision fermentation methods. General information on the application of recombinant proteins in the food industry is provided. The role of recombinant proteins in modern food production is highlighted.

Conclusion: The development of molecular biotechnology has led to the creation of new enzymes and proteins for the food industry, expanding their use in cheese making, confectionery, and baking. Challenges exist in developing new enzymes, expression systems for bioproduction, and bioprocesses with fundamentally new characteristics, leading to greater economic feasibility. The analysis revealed challenges related to the need for regulatory compliance with current ca-pabilities and trends in the bioproduction of recombinant proteins for the food industry. The re-sults obtained can be used to improve the catalytic properties of recombinant enzymes and en-hance the stability of enzyme preparations. These findings are useful for the targeted development of recombinant protein and enzyme production systems, increasing their productivity through a better understanding of the main directions of the modern recombinant enzyme indus-try for food production.

Keywords: enzymes, recombinant proteins, producer strains, regulation of recombinant enzymes, genetically modified organisms, GM products, industrial protein synthesis biotechnology, protein bioengineering, genetically modified food sources

Correspondence:
Filkin Sergey
E-mail: s.filkin@fbras.ru

Conflict of interest:
The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 03.10.2023
Revised: 30.05.2023
Accepted: 15.06.2024
Published: 30.06.2024

Copyright: © 2024 The Authors

To cite: Filkin, S., Lipkin, A., & Fedorov, A. (2024). Application of recombinant proteins in contemporary food biotechnology: A scoping review. FOOD METAENGINEERING, *2*(2), 47-74. https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.46

Список сокращений:

ГФС — глюкозо-фруктозный сироп,
LCA — life cycle assessment, оценка жизненного цикла,
GWP — global warming potential, потенциала глобального потепления,
PLA — фосфолипазы A,
PLB — фосфолипаза B,
ЕАЭС — Евразийский Экономический Союз,
FDA — U.S. Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США,
EFSA — Европейское агентство по безопасности продуктов питания,
GRAS — Generally recognized as safe- «общепризнанно как безопасно», статус выдаваемый FDA для отдельных компонентов.

ВВЕДЕНИЕ

Пищевая промышленность является одной из самых консервативных в отношении стандартов качества продукции, поскольку от данных стандартов зависит здоровье и безопасность народонаселения. Однако, с течением времени, меняются представления о технологиях пищевого производства, как результат, появляются новые технологические решения, в том числе и в пищевом производстве. В связи с бурным развитием биотехнологии с 1990 года по 2024 год на рынке пищевого производства появляются новые технологические решения, такие как рекомбинантные ферменты, продуцируемые генетически-модифицированными организмами (Deckers et al., 2020), рациональный дизайн рекомбинантных ферментов для повышения эффективности (Liu et al., 2024), прецизионная ферментация для продукции заданных рекомбинантных белков (Ashok et al., 2023), и впредь этот процесс будет идти по нарастающей (Siddiqui et al., 2023).

Белки являются природными высокомолекулярными биополимерами, состоящие из отдельных аминокислотных остатков, соединенные между собой пептидной связью. В состав большинство белков входит 20 стандартных аминокислотных остатка, кодируемых при помощи генетического кода. Множественные комбинации аминокислотных остатков позволяют формировать различные белки, а это в свою очередь позволяет белкам выполнять различных функций (Tekaia & Yeramian, 2006). Рекомбинантные белки — это белки, ДНК которых была создана искусственно. Обычно в качестве организма для продукции рекомбинантных белков выступают либо бактерии (*E.coli, B.subtilis*), либо дрожжи (*S.cerevisiae, P.pastoris)*, либо мицелиальные грибы (*A.niger, T.reesei*). Использование микроорганизмов позволяет стандартизировать и масштабировать процессы продукции и очистки рекомбинантных белков (Crowell et al., 2021).

Растущее с 2010 по 2024 годы внимание к проблеме биопродукции рекомбинантных белков и ферментов у населения усиливает научный интерес и к практическим аспектам геномного редактирования штамм-продуцентов, метаболической инженерии и использованию подходов прецизионной ферментации в пищевой промышленности (Deckers et al., 2020). Рекомбинантные белки подразделябтся на три категории (Augustin et al., 2023): ферменты, применяемые в пищевом производстве (Raveendran et al., 2018), белки, меняющие вкус продуктов (Dufossé & Fouillaud, 2019), и белки-аналоги основных белков натуральных продуктов, получаемые в результате ферментации (Linder, 2023).

Внедрение новых методов генетической инженерии (Shankar & Hoyt, 2017), масштабирования ферментационных процессов, выделения и очистки рекомбинантных белков привело к революционным изменениям в производстве рекомбинантных белков (Augustin et al., 2023). Данные изменения затрагивают многие области современной биотехнологии, в том числе и пищевую биотехнологию. Традиционно применяющиеся ферменты из природных источников становятся экономически неконкурентоспособными по сравнению с рекомбинантными ферментами (Adrio & Demain, 2014).

Цель текущего обзора предметного поля — отобразить основные тенденции в области биопродукции рекомбинантных белков и ферментов. Исследовательские вопросы:

(1) В каких областях используют ферменты определенных классов (амилазы, протеазы, липазы)? Почему происходит замена природных ферментов рекомбинантными?
(2) Какие технологические платформы используются для экспрессии рекомбинантных ферментов?
(3) Какие новые области использования рекомбинантных белков появились?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол и заявление о прозрачности исследования

Представленный обзор предметного поля выполнен с использованием протокола PRISMA-ScR. Авторы подтверждают, что данная рукопись представляет собой прозрачный, точный и честный отчет о проведенном исследовании.

Критерии отбора

В обзор включены исследовательские статьи и труды конференций, подходящие под критерии отбора. Анализировались статьи на всех языках, ограничений на географию исследования также не было. Критерии отбора источников сформулированы в соответствии с рамкой PCC (Population, Concept, Context) (Таблица 1).

Также дополнительным критерием являлось наличие доступа к полному тексту статьи. В случае отсутствия такого доступа, полный текст работы запрашивался у авторов, если авторы работ не предоставляли доступ к тексту, то работа исключалась из обзора.

Стратегия поиска

Для поиска в базах данных Pubmed, Scopus и ScienceDirect автор использовал поисковые запросы по ключевым словам: «food enzyme», «food industry», «recombinant protein production», «enzyme», «amylase», «protease», «lipase » с опорой на операторы поиска AND, OR. В контексте поискового запроса использовались фильтры — исключить публикации из следующих предметных областей, «Здравоохранение», «Социальные и гуманитарные науки», «Науки о Земле», «Фармацевтика, токсикология и фармакология». В базы данных РИНЦ был произведен поиск по запросу: (ферменты OR рекомбинантный белок) AND «пищевое производство» OR «регулирование».

Таблица 1

Критерии отбора источников

Критерий	Включено	Исключено	Причины
Популяция	Создание штаммов-продуцентов рекомбинантных белков и ферментов, используемых в пищевых технологиях.	Создание трансгенных растений и животных, продуцирующих рекомбинантные белки с заданными свойствами; создание методами метаболической инженерии микроорганизмов с заданными свойствами, продуцирующих дополнительные питательные соединения; создание микроорганизмов с измененными свойствами, применяемых в современном виноделии и молочнокислом брожении с целью получить конечный продукт с заданными свойствами.	Фокус исследования направлен на изучение рекомбинантных белков и ферментов, продуцируемых микроорганизмами, в пищевой промышленности.
Концепция	Исследование посвящено белкам и ферментам, применяемым в пищевых технологиях, их классификации, особенностям биопродукции и их регулированию в различных странах.	Исследование других биотехнологических объектов применяемых в пищевом производстве (липиды, витамины, сахара).	Целью данного исследования является прояснение вопросов о рекомбинантных белках в пищевом производстве для способствования развития данной отрасли
Контекст	Исследования, направленные на изучение рекомбинантных белков в пищевой промышленности	Исследования, направленные на изучение продуктов других отраслей.	Исследование сфокусировано на изучении работ, посвященных рекомбинантным белкам в пищевой промышленности
Язык	Любой	Нет ограничений	В связи с использованием актуальных источников будут рассмотрены статьи на всех языках.
Временной период	С 1973 года по март 2024 года	До 1973 года	В источниках ранее 1973 года не обнаружено актуальной информации по заданной теме обзора.
География	Любые страны	Нет ограничений	Проблема использования рекомбинантных белков в пищевой промышленности не имеет границ

Процесс отбора источников

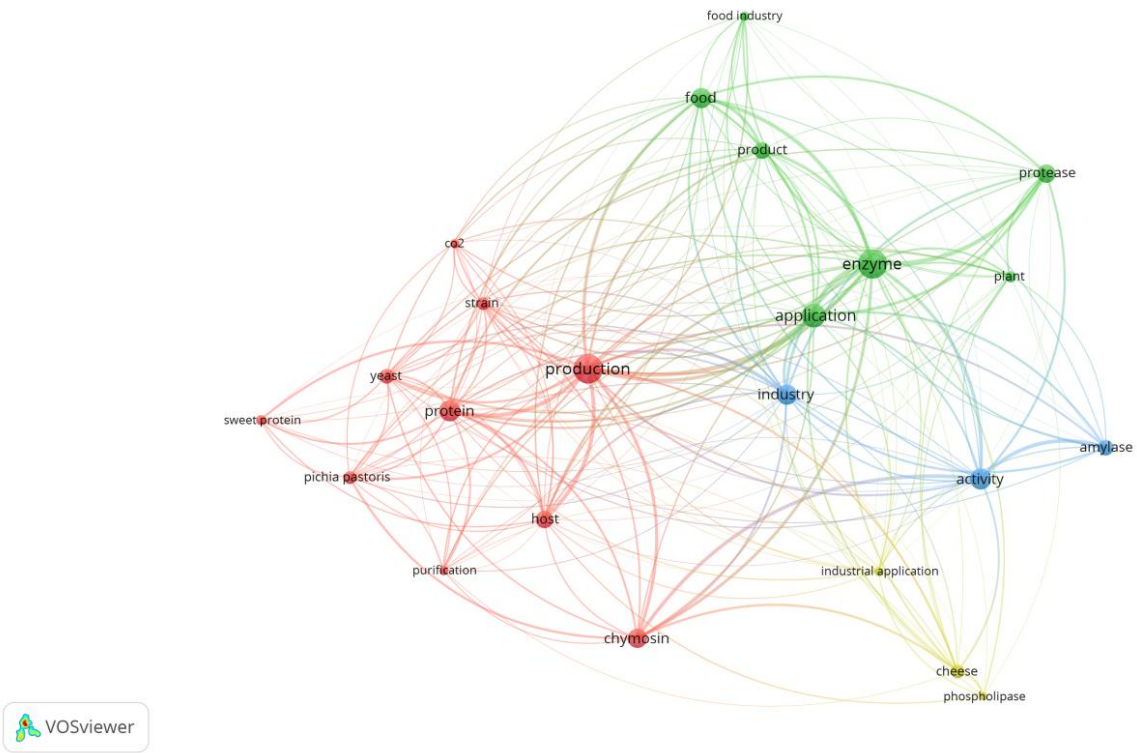
Полученные результаты поиска анализировались и отбирались в соответствии с протоколом PRISMA-ScR. На первом этапе исследования список публикаций, а также информация о них были выгружена в формате .ris и загружены в менеджер ссылок «Zotero», полные тексты статей были загружены в формате .pdf. Далее, список публикаций в «Zotero» был проверен на наличие дубликатов. Обнаруженные дубликаты были исключены. После исключения дубликатов, статьи подвергались скринингу на соответствие критериям отбора в два этапа. Сначала анализ реализовывался по названию и аннотации, а затем по полному тексту. Все прошедшие отбор публикации далее были включены в обзор предметного поля.

Извлечение и анализ данных

Из отобранных работ была извлечена следующая информация: имена авторов и информация о странах происхождения, цель и дизайн исследования, выводы, год публикации. Все включенные в обзор источники были обработаны в программном обеспечении VOSViewer для наглядного представления частотности встречаемости ключевых слов (Рисунки 1, 2, 3).

Рисунок 1

Частота встречаемости ключевых слов



Примечание. Размер точки определяется частотой встречаемости (чем больше, тем чаще). Цветом и линиями показаны связи между ключевыми словами в исследованиях

Рисунок 2

Частота встречаемости ключевых слов по годам

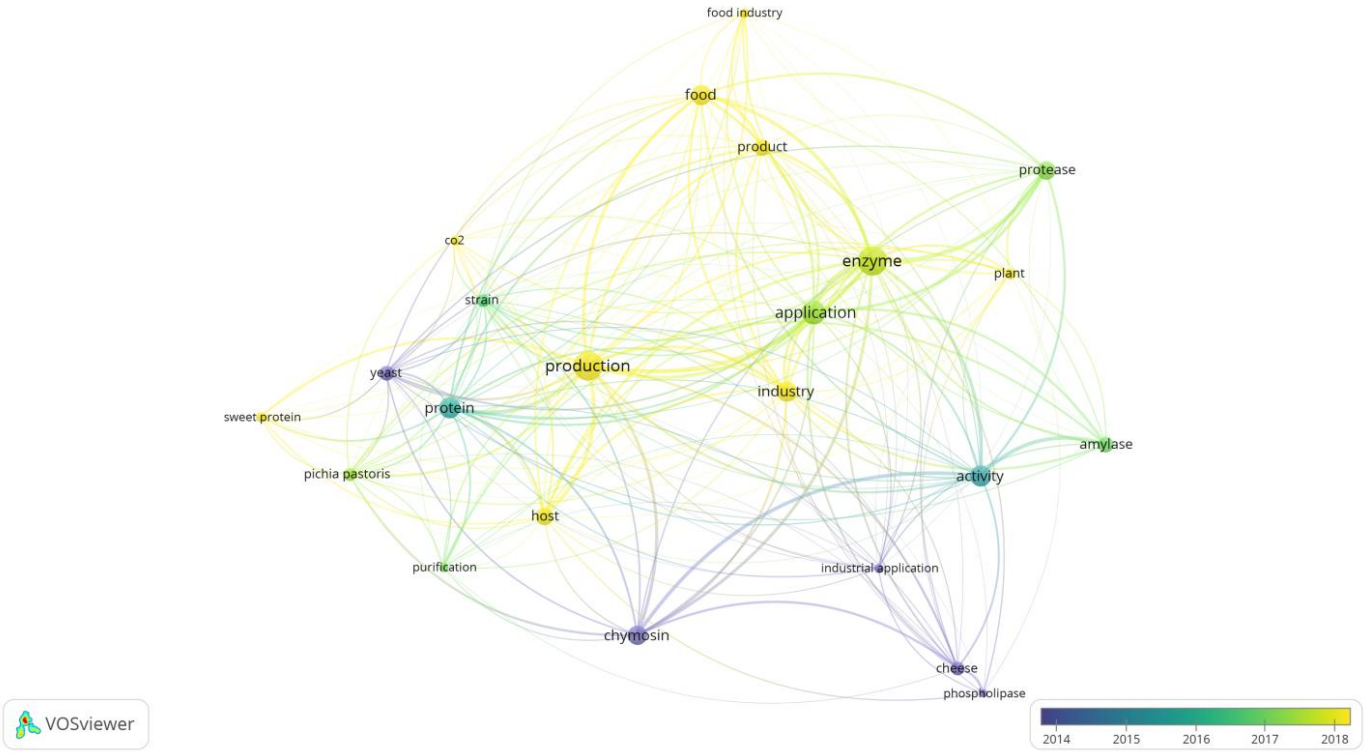
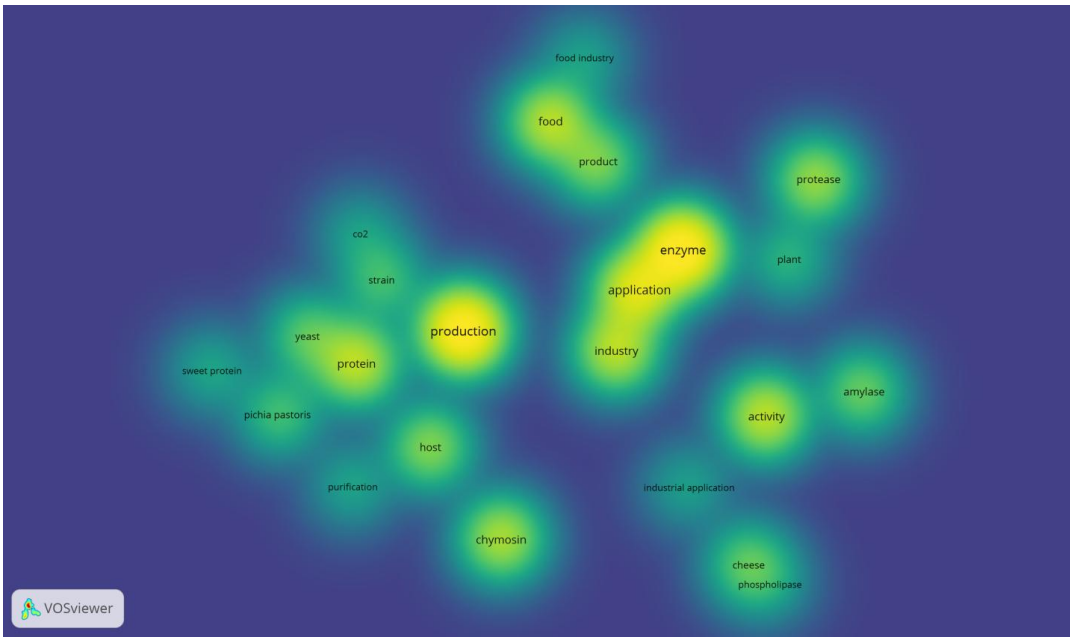


Рисунок 3

Плотность встречаемости ключевых слов



Примечание. Встречаемость ключевых слов показана яркостью и размером круга

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данный обзор включено 109 источников. Авторы 22 из них представляют США, 31 автор — из стран Европейского Союза (из них 11 из Германии), 17 авторов из Российской Федерации, 24 автора из стран «Глобального Юга» (из них 10 авторов из Индии, 5 авторов из Китая). 83,5 % источников опубликованы на английском языке, 16,5 % на русском языке.

79,2 % статей опубликованы с 2014 по 2024 год. Больше всего цитирований получили работы 2021 и 2023 годов (13,2 %).

Сеть ключевых слов, созданная при помощи *VOSViewer* зафиксировала кластеризацию исследований в соответствии с отраслями производства. Так, кластер по слову «ферменты» разделен на три части: ферменты для сыроделия, амилолитические ферменты, протеазы. Отдельно представлен кластер, связанный с точечной дрожжевой ферментацией: экспрессией различных целевых белков в *Pichia pastoris* и белков-подсластителей в частности.

Ферменты, используемые в пищевой промышленности

Общая характеристика ферментов для пищевой промышленности

Современное производство множества пищевых продуктов невозможно без промышленных пищевых ферментов. Список наиболее востребованных индустриальных ферментов приведен в Таблице 2.

Таблица 2

Критерии отбора источников

Кодификационный номер	Пищевой фермент
A.01	α- ацетолактатдекарбоксилаза
A.02	Аминопептидаза
A.1	Амилаза
	(i) β-Амилаза
A.2	Амилаза (maltogenic)
	(i) α- Амилаза (maltogenic)
A.3	Аспаргиназа
B.1	Бычий сычужный фермент
B.2	Бромелаици́н
C.01	Карбоксипептидаза Д
	(i) Карбоксипептидаза Д
C.1	Каталаза
C.2	Целлюлаза
C.3	Химозин
C.4	Ципрозин (нат./рекомбинантный)
F.1	Фицин
G.1	Глюкоамилаза
G.2	β-Глюканаза
G.3	Глюкоксидаза
G.4	Глюкоизомераза
G.5	Глутаминаза
H.1	Гемицеллюлаза
H.2	Гексозооксидаза
I.01	Инулиназа
I.1	Инвертаза
L.1	Лактаза
L.2	Липаза
L.3	Липооксидаза
L.4	Лизоцим
M.01	Маннаназа
M.1	Молоко-свертывающий фермент
P.1	Панкреатин
P.2	Папаин
P.3	Пектиназа
	(i) Пектинлиаза
	(ii) Пектинэстераза
	(iii) Полигалактуроназа
P.4	Пентозаназа
P.5	Пепсин
P.5.1	Пероксидаза
P.5.2	Фосфолипаза
	(i) Лизофосфолипаза
P.6	Протеаза
	(i) Кислая пролил-эндопептидаза
	(ii) Термолизин
	(iii) Субтилизин
P.6.1	Протеин-глутаминаза
P.7	Пуллуланаза
R.1	Сычужный фермент
T.01	Трансглутаминаза
T.1	Трипсин
U.1	Уреаза
X.1	Ксиланаза

Примечание. Основан на канадском списке разрешенных пищевых ферментов List of Permitted Food Enzymes. SOR/2012-206 Government of Canada (2023)[1], адаптировано Dekkers et al., 2021.

[1] Government of Canada (2023). List of Permitted Food Enzymes (Lists of Permitted Food Additives).

Ферменты для пищевой промышленности применяют для обработки белков, жиров и углеводов (Dahiya et al., 2020). Для расщепления отдельных белков на мономеры активно используют различные протеазы, для гидролиза сложных углеводородов применяют амилазы, глюкоамилазы и другие ферменты, для расщепления липидов и эмульгации жирных кислот и используют липазы и фосфолипазы. Для каждого из этих ферментов требуется оптимизация химической последовательности, подбор экспрессионной системы, штамма-продуцента и условий культивирования клеток, а также разработка способа выделения, очистки, хранения и применения в технологическом процессе (Рисунок 4).

Пищевые ферменты разделяют по характеру катализируемой реакции (гидролазы, эстеразы, оксидазы и др., Таблица 3) (Motta et al., 2023). Другой способ классификации пищевых ферментов основан разделении на отдельные технологические процессы и ферменты, которые в них задействованы. Таким образом, можно проследить основные вехи использования ферментов и спрогнозировать развитие отрасли (Singh et al., 2016) (Таблица 4).

Ферменты в пищевой промышленности повышают скорость технологических процессов, увеличивают выход готовой продукции, улучшают качество продуктов, по-

Таблица 3

Пищевые ферменты по типу катализируемой реакции

Класс	Функции	Подклассы ферментов в продуктах питания
Оксидоредуктаза	Катализируют окислительно-восстановительные реакции	Пероксидаза, полифенолоксидаза, каталаза, липоксигеназа, глюкозоксидаза
Трансфераза	Перенос химических групп от субстрата к молекулам акцепторам (кроме водорода и воды)	Трансглутаминаза
Гидролаза	Катализируют реакцию путем добавления молекул воды, что приводит к разрыву нескольких химических связей	Амилаза, инвертаза, лактаза, липаза, пектиназа, лизоцим, протеазы
Лиаза	Катализирует связывание и разрыв связей, кроме гидролиза или окислительно-восстановительных реакций	Пектинлиаза, пектатлиаза
Изомераза	Катализирует изомеризацию (изомеры: одна и та же молекулярная формула, но разные структурные свойства)	Глюкозоизомераза

Примечание. Адаптировано из Motta et al., 2023.

Рисунок 4

Основные группы индустриальных ферментов и направления их промышленного применения

Примечание. Адаптировано из Kaur & Gill (2019).

Таблица 4

Основные отрасли пищевой промышленности и конкретные примеры использования ферментов

Отрасль пищевой промышленности	Фермент	Для чего используется	Штамм-продуцент
Хлебобулочная промышленность	Амилаза	Усиление мягкости хлеба	*Aspergillus sp., Bacillus sp.*
	α-амилаза	Увеличение времени хранения хлеба	*Bacillus strearothermophilus*
	Ксиланаза	Обминка теста	*Aspergillus niger*
	Липаза	Обминка теста	*Aspergillus niger*
	Трансглутаминаза	Приготовление теста	*Streptomyces sp.*
	Нейтральная протеаза	Стабилизатор лапши	*Aspergillus oryzae*
Изготовление молочных продуктов	Химозин	Производство сыра	*Aspergillus sp., Kluyveromyces lactis*
	Липазы	Обогащение вкуса и аромат сыра, сокращение срок его созревания	*Aspergillus oryzae*
	β-галактозидаза	Безлактозные продукты	*E.coli, Kluyveromyces lactis*
	Аминопептидаза	Созревание сыра	*Lactobacillus sp.*
	Каталаза	Созревание сыра	*Aspergillus niger*
	Трансглутаминаза	Переработка молока, мяса и других видов пищевого сырья	*Streptomyces sp.*
Производство соков, виноделие и ликероводочная промышленность	Глюкооксидаза	Удаление кислорода для увеличения время хранения пива	*Aspergillus niger, P.pastoris*
	Целлюлаза	Разжижение фруктов	*Aspergillus niger*
	Нейтральная протеаза	Осветление вина, пивоварение	*Aspergillus oryzae*
	β-амилаза	Гидролиз крахмала	*Bacillus, Streptomyces*
	β -глюканаза	Осветление напитков	*Bacillus subtilis, Aspergillus spp.*
	Протеаза	Осветление напитков	*Aspergillus niger*
	Пуллуланаза (амило-альфа-1,6-глюкозидаза))	Осахаривание крахмала	*Bacillus sp.*
	Наринганаза	Уменьшение горечи цитрусовых напитков	*Aspergillus niger*
	Лимониназа	Уменьшение горечи цитрусовых напитков	*Aspergillus niger, A.oryzae*
	Аминопептидазы	Разрушение белка	*Lactobacillus brevis*
	Пектиназа	Удаление пектина	*A.oryzae, Penicillium funiculosum*

Примечание. Адаптировано из Singh et al., 2016.

зволяют сэкономить ценное сырье и снизить количество отходов (Borrelli & Trono, 2015). Ферментные препараты подразделяются на ферменты природного (растительного и животного происхождения) и искусственного (рекомбинантного) происхождения (Robinson, 2015). Ферментные препараты животного происхождения получают из органов и тканей сельскохозяйственных животных. Например, сычужный фермент, представляющий из себя смесь 70 % химозина и 30 % пепсина, используется в сыроделии (Kumar et al., 2010).

Природные препараты растительного происхождения получают при отжиме сока из различных частей растений. Так, протеазы папаин и бромелаин получают из млечного сока дынного дерева *Cárica papáya* и сердцевины плодов ананаса *Ananas comosus* соответственно (Fernández-Lucas et al., 2017). Ещё одним широко распространённым ферментным препаратом является фицин из стеблей и листьев финикового дерева *Ficus insipida* (Aider, 2021). Бромелаин представляет собой смесь четырех отличных протеаз. Папаин, фицин и бромелаин активно в процессах тендеризации мяса, а также других процессах в пищевой промышленности (Arshad et al., 2014).

Используются и специальные штаммы микроорганизмов, бактерий, мицелярных грибов, дрожжей (Cairns et al., 2018). Рекомбинантные ферменты выращивают в искусственно созданных микроорганизмах, рекомбинантные ферменты не отличаются от натуральных. Природные штаммы для получения ферментов стали использовать в конце XIX века. Первые искусственные микроорганизмы для продукции ферментов стали по-

лучать сначала селекционными, а затем и генно-инженерными методами (Ashok et al., 2023).

Использование ферментов в пищевой промышленности имеет множество плюсов: ферменты повышают эффективность технологических процессов при производстве продуктов питания, увеличивают объем выхода готовой продукции, улучшают органолептические свойства продукта (вкус, запах, консистенция, окраска, внешний вид и т.д.) (Solanki et al., 2021). Чем больше фермента необходимо, тем выше эффективность именно биотехнологического процесса с применением микроорганизмов. Так, например, для производства сычужного фермента традиционным способом необходимо экстрагировать химозин из сычуга телёнка (примерно 10 кг сычужного фермента с одного телёнка, необходимо несколько месяцев интенсивного труда, чтобы вырастить и накормить телёнка). В то же время 1000 л ферментер с штаммом-продуцентом рекомбинантного химозина *Bacillus subtilis* даст продукцию 20 кг фермента за 12 ч (Robinson, 2015). Таким образом применение рекомбинантных микроорганизмов предпочтительно не только с экономической стороны вопроса, но и с этической.

Создание каждого штамма-продуцента имеет определенный постоянный шаблон: выбор экспрессионной модели, подбор вектора для экспрессии целевого гена, отбор отдельных клонов, выбор оптимальной схемы очистки (Spohner et al., 2015). И в то же время каждая отдельная разработка уникальна — так как она зависит от физико-химических свойств фермента и его функции (Robinson, 2015). Для отдельного технологического процесса важен не только уровень продукции рекомбинантного фермента, но и эффективность, масштабируемость и дешевизна применяемого способа очистки. Чем больше необходимо производить отдельного фермента, тем более недорогим и неприхотливым должен быть биотехнологический процесс (Khootama et al., 2018). Для соблюдений этих требований постоянно происходит и улучшение самого штамма-продуцента и ферментационного процесса и генно-инженерное улучшение самого рекомбинантного белка за счет изменения его каталитических функций, специфичности за счет методов белковой инженерии (Liu et al., 2019). Один и тот же рекомбинантный фермент может применяться в разных отраслях пищевого производства. Так, α-амилаза применяется в производстве глюкозо-фруктозного сиропа, хлебобулочной промышленности и при производстве соков (Farooq et al., 2021).

Многие из перечисленных выше рекомбинантных белков применяют не по отдельности, а используют для получения комплексных решений в области пищевых технологии. Так, уже существуют смеси ферментов для эмульгирования жиров яичного желтка, осветления вина и фруктовых соков, для пивоваренной промышленности, готовые смеси ферментов для вызревания сыра, и хлебобулочной промышленности (De Maria et al., 2007). Использование готовых стратифицированных смесей ферментов позволяет стандартизировать рецептуры и лучше следить за контролем качества конечного продукта. Так же есть некоторое различие и в микроорганизмах, которые используются для продукции рекомбинантных белков для пищевой промышленности (Deckers et al., 2020).

Бактериальные системы для продукции — наиболее неприхотливые и недорогие. Однако, из-за отсутствия сложной эукариотической системы фолдинга, в бактериальных системах могут продуцироваться далеко не все белки, а наиболее простые белки (Baeshen et al., 2015). Также бактериальные системы не могут продуцировать белки с пост-трансляционными модификациями, например гликопротеины. С точки зрения очистки, они продуцируют большое количество побочных белков, таким образом, рекомбинатные белки из бактерий могут требовать более сложной очистки (Jia & Jeon, 2016). Обычно в качестве бактериальных систем для продукции рекомбинантных белков используют *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens*. Для *E.coli* существует больше различных молекулярно-биологических инструментов, однако штаммы рода *Bacillus* дают больший выход по рекомбинантному белку. В частности, штаммы рода *Bacillus* используются для продукции α-амилазы и различных протеаз (Vojnovic et al., 2024).

В качестве экспрессионной системы используются мицелярные грибы *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae,* и *Trichoderma reesei*. Они позволяют получить высокие выходы рекомбинантных белков, особенно если исходный фермент также экспрессировался в грибах (Meyer et al., 2015). Они имеют эукариотическую систему фолдинга, однако более сложны в обращении, а также выделяют множество побочных продуктов при культивировании, что усложняет очистку. В данной экспрессионной систем получают липазы, глюкооксидазу и множество других ферментов (Meyer, 2008).

В качестве потенциальной платформы для производства рекомбинантных ферментов всё больше

возрастает роль дрожжевых систем (Spohner et al., 2015). Наличие сильных промоторов, возможность продуцировать рекомбинантный белок в относительно чистом виде, высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков, эукариотическая система фолдинга и гликозилирования — всё это преимущества системы экспрессии *P.pastoris*. Именно эту систему экспрессии используют для получения рекомбинантных ферментов, таких как инулаза (Zhang et al., 2004), лакказа (Püllmann & Weissenborn, 2021), лактаза (Bankefa et al., 2022; Sun et al., 2017), и фитаза (Herrera-Estala et al., 2022).

Совокупный мировой рынок индустриальных ферментов оценивается в 7,4 млрд. долларов США на 2023 год и этот рынок растет в среднем на 6,6 % в год[1]. По итогам 2022 года мировой рынок сывороточного белка оценивался в $19,6 млрд., а к 2032 году, по прогнозам, достигнет $40,3 млрд.[2] При этом растет спрос на безлактозный белок. Ученые утверждают, что непереносимость лактозы есть у 68 % населения Земли (Bayless et al., 2017).

Основные производители на мировом пищевом рынке это: Novozymes (Дания), BASF (Германия), DSM (Нидерланды), Epigen Labs (ОАЭ), Du Pont (США), Tex Biosciences (Индия), Chr.Hansen (Дания). Основными игроками на российском рынке пищевых ферментов являются иностранные компании: Barentz Group, Chr Hansen, Kerry Group, Cargill Inc и ADM. Ожидается, что российский рынок пищевых ферментов будет расти в среднем на 5,3 % в течение прогнозируемого периода с 2020 по 2025 год[3].

Производство глюкозо–фруктозного сиропа. Амилаза, глюкоамилаза

Сахар и продукты, содержащие сахара (мед, фрукты), всегда были частью рациона питания человека. Сахароза выступает в качестве основной меры вкуса сладкого. Однако, промышленное производство сахарозы из сахарного тростника и свеклы сталкивается с рядом технических сложностей: необходимо избавиться от примесей, а затем рафинировать полученный сахарный сироп.

Глюкозо–фруктозный сироп (ГФС) — жидкий подсластитель, который используется в производстве множества продуктов и напитков. ГФС — самое крупное технологическое производство в пищевой индустрии и непревзойденный триумф биотехнологии. Ежегодно в мире производится 20 млн. тонн ГФС[4]. Созданная технология способна производить такие фантастические объемы продукции. В качестве сырья для производства ГФС используется чаще всего кукуруза. В Европе (в т.ч. РФ) используется пшеница и картофельный крахмал. Самые ранние разработки по ферментативному производству ГФС относятся к началу 1960-х годов в Японии с последующим выходом на промышленные масштабы в конце 1960-х годов. Рост использования ГФС в пищевой промышленности продолжается уже более 35 лет и является одним из наиболее успешных проектов (White, 2008).

Для производства ГФС важно то, что он является альтернативной сахарозе. Глюкозо–фруктозный сироп стабилен в жидком виде, его можно использовать в кислых продуктах. Технологию производства ГФС разработали в Японии, но начали активно применять в США для стабилизации цен на сахар. В качестве основного сырья для его производства использовалась кукуруза, что позволило стабилизировать и сильно снизить цену на сахарный сироп, а США стать независимой от поставок сахарного тростника из Южной Америки (Ballinger, 1978).

Использование ГФС так же безопасно, как потребление сахарозы, глюкозы и фруктозы, и не оказывает негативного влияния на здоровье, за исключением воздействия на зубы (Glinsmann et al., 1986). Вопросы влияния ГФС на ожирение и состав микрофлоры, а также регулирование его потребления относятся к ответственности потребителей и диетологов, а не контролирующих органов (Bray et al., 2004).

Процесс производства ГФС подразумевает использование как минимум трех различных ферментов для производства конечного продукта — амилазы, глюкоамилазы, глюкоизомеразы (Рисунок 5).

---

[1] Formulation and Region — Global Forecast to 2028. (2023) Industrial enzymes markets by type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases, Nucleases). https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html

[2] Shahbandeh M. (2023) Value of the whey protein market worldwide from 2022 to 2032. https://www.statista.com/statistics/728005/global-whey-protein-market-size/

[3] Mordor intelligence. (2023) Анализ размера и доли рынка пищевых ферментов в России — тенденции роста и прогнозы (2023 — 2028 гг.). https://www.mordorintelligence.com/ru/industry-reports/russia-food-enzymes-market

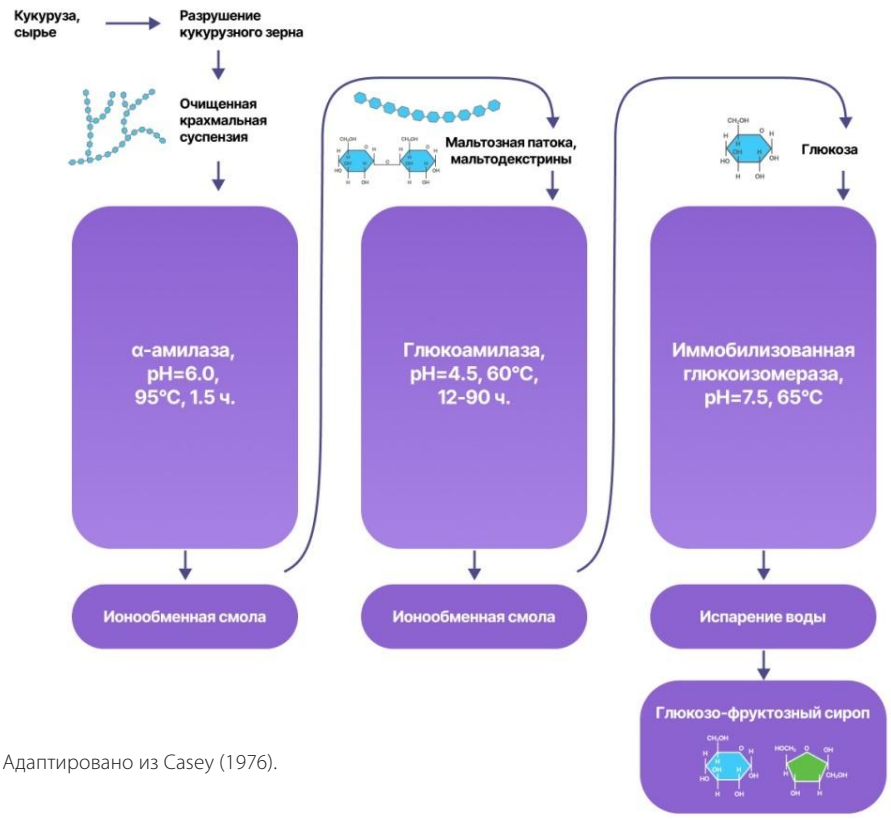
[4] Bode J. W. (2018). Corn Refiners Association Industry Overview 2017. https://corn.org/wp-content/uploads/2018/04/CRA-Industry-Overview-2017.pdf

Сначала кукурузные зерна очищают от посторонних примесей. Очищенную кукурузу вымачивают в теплой воде в присутствии SO_2, затем размягченные зерна измельчают для получения крахмальной суспензии. Полученный крахмал расщепляется под действием иммобилизованной альфа-амилазы на более короткие олигосахариды. Под действием второго фермента глюкоамилазы происходит расщепление на моносахариды и глюкозу. Полученный раствор деминерализуют при помощи ионно-обменной смолы. А за тем пропускают через иммобилизованную глюкоизомеразу, которая позволяет получить сироп в конечной композиции (HFCS 42; 50–52 % глюкозы, 42 % фруктозы) (Bhosale et al., 1996) (Таблица 5).

Все три фермента, используемых в этом процессе — α-амилаза, глюкоамилаза, глюкоизомераза — рекомбинантные белки, получаемые микроорганизмами. α- амилаза занимает 25–30 % всего рынка рекомбинантных ферментов (Singh et al., 2022).

Рисунок 5

Схематическое изображение ферментативных стадий при производстве глюкозо-фруктозного сиропа (ГФС)



Примечание. Адаптировано из Casey (1976).

Таблица 5

Углеводный состав основных подсластителей

Компонент	HFCS-42	HFCS-55	Кукурузный сироп	Фруктоза	Сахароза	Инвертированный сахар	Мёд
	%	%	%	%	%	%	%
Фруктоза	42	55	0	100	50	45	49
Глюкоза	53	42	100	0	50	45	43
Другие	5	3	100	0	0	10	5
Содержание влаги	29	23	20	5	5	25	18

Примечание. Адаптировано из White (2008).

Амилаза была открыта в Санкт-Петербурге Готтлиб Константином Сигизмундовичем Кирхгофом в 1811 году в результате наблюдения за деградацией крахмала. Эрхард Леуч в 1833 году описал наличие в слюне «птиалина», участвующего в гидролизе крахмала. В 1833 году французские химики Пайен и Персо выделили амилазу и назвали ее «диастаза». В 1894 Дзёкити Такамине получил патент на способ промышленной продукции амилазы из *Aspergillus oryzae* (первый фермент из микроорганизмов в США). В 1925 Кухн ввел в оборот термин α-амилаза (Singh et al., 2022).

Со времени начала использования ферментативной технологии производства глюкозо-фруктозного сиропа, произошло множество качественных изменений: оптимизировались каталитические активности амилазы, глюкоамилазы и глюкоизомеразы, разработана технология иммобилизации глюкоизомеразы, позволяющая тратить меньше фермента в каталитическом процессе. Однако главная проблема так и не решена: все три фермента катализируют реакцию в разных условиях, при разных температурах и разном pH. Именно это делает необходимым условием использования огромного количества ионообменных смол в многотонном производстве (Bessler et al., 2003).

Решение прикладной биотехнологической проблемы — приведение каталитических условий трех ферментов к единому формату за счет рациональной белковой инженерии позволит удешевить производство ещё сильнее и сделать его более экологически ответственным. Данная нерешенная проблема еще ждёт своего часа.

Липазы, фосфолипазы и потребность в ферментах для эмульгации

Липазы и фосфолипазы имеют важное значение для пищевой промышленности (Fernandes, 2010; Filkin et al., 2020) Наиболее типичные области использования липаз — производство пищевых масел, молочных продуктов и хлебобулочных изделий или эмульгаторов (De Maria et al., 2007; Raveendran et al., 2018; Алексеенко & Предыбайло, 2008). Использование секретируемой фосфолипазы А2 из свиной поджелудочной железы или ядов змей имеет давние традиции в производстве яичного желтка для эмульгирования в майонезе, соусах, хлебопекарной промышленности или очистке растительных масел (De Maria et al., 2007).

В 2024 году коммерческие продукты, содержащие фосфолипазы А2, можно найти под разными торговыми названиями: (1) Lecitase® 10 L (Novozyme A/S, Denmark) — фосфолипаза животного происхождения (из свиной поджелудочной железы), изначально разработанная для дегуммирования растительных масел; (2) микробные фосфолипазы Rohalase® MPL (AB Enzymes, Germany) и Maxapal®A2 (DSM Food Specialties, The Netherlands) из штамма *A. niger* для улучшения эмульгирующих свойств яиц и яичного желтка; (3) микробные фосфолипазы в смеси ферментов CakeZyme® и BakeZyme® DMS Food Specialties (The Netherlands) для пекарных целей (Filkin et al., 2020).

Наиболее распространенными штаммами для крупнотоннажного производства являются *Streptomyces sp.* и экспрессионная система *A. niger.* Эти штаммы занимают 80 % всего производственного рынка дегуммирования масла (Borrelli & Trono, 2015). Ферменты могут использоваться повторно или иммобилизоваться, что повышает выход продукта и снижает эксплуатационные затраты. Поэтому использование фосфолипаз в масличной промышленности представляется привлекательной альтернативой используемой традиционной методике дегуммирования (Khamies et al., 2024). Использование фосфолипаз для промышленного дегуммирования растительного масла позволяет снизить расход воды и снизить выброс CO_2 в атмосферу на 12000 тонн CO_2 ежегодно (Borrelli & Trono, 2015).

Хлебопекарная промышленность

Ещё одной перспективной областью использования липаз является хлебопекарная промышленность. Для преодоления трудностей с переработкой, низкими объемами и неприемлемым качеством сырья использую различные способы улучшения эмульгации, в том числе и внесение ферментов типа амилаз, оксидаз, гемицеллюлаз и протеаз в процессе приготовления теста (Fraatz et al., 2014). Среди всех ферментов, используемых в пищевой промышленности, треть идет на нужды хлебопекарной промышленности (Casado et al., 2012).

В составе теста относительно небольшое количество липидов (2–2,8 % сухого вещества в пшеничной муке), однако они сильно влияют на стабильность пузырьков воздуха в составе теста, что объясняется их способностью образовывать липидные монослои на границе фаз газ/жидкость, тем самым увеличивая воздушность теста. К сожалению, это количество липидов недостаточно для существенного влияния на качество теста и конечных продуктов. Поэтому для обеспечения качества продуктов и увеличения срока хранения хлебобулочных изделий необходимы экзогенные

липиды или эмульгаторы. Эти вещества способствуют стабилизации пузырьков воздуха, что приводит к увеличению объема хлеба, усилению клейковины, укреплению структуры и увеличению срока хранения (De Maria et al., 2007).

Еще одна важная отрасль использования липаз — переработка молочных продуктов для улучшения стабильности жиров или увеличения выхода сыра, масла и мороженого. Традиционные способы применения ферментов включают ускорение процесса созревания сыра или производство липолизированного молочного жира для использования в качестве ароматизатора в сливочном масле, кофе, сыре или шоколаде (Ardö, 2021).

Молоко представляет собой сложную дисперсию, основной составляющей которой является вода. Так же в состав молока входят белки, жиры, углеводы и различные соли. Липиды присутствуют в виде дисперсных капель, стабилизирующих глобулы с молочным жиром, препятствуя коагуляции. При изготовлении сухого молока молекулы фосфолипидов покрывают частицы порошка, улучшая термостабильность восстановленного молока, а мороженому (являющемуся пеной или эмульсией, включающей кристаллы льда и незамерзшую фракцию с белками) фосфолипиды придают дополнительный объем и устойчивость (Rathnakumar et al., 2023).

В производстве сыров типа моцарелла использование коммерческого продукта YieldMAX® компании Novozymes A/S, состоящего из фосфолипаз типа PLA1, PLA2 и PLB, увеличило выход сыра на 0,7–3,8 %. Эмульгирующие свойства лизофосфолипидов в составе сыра выше, чем у фосфолипидов, вследствие чего большее количество молочного жира и белков захватывалось сырной массой, а не оставалось в сыворотке. Кроме того, было показано, что использование фосфолипаз в производстве сыров с пониженным содержанием жира (<5 % в сухом веществе) также способствует увеличению выхода продукта (Lilbaek et al., 2006).

Другой липазный препарат FoodPro CLEANLINE от Danisco A/S обладает активностью ацилтрансферазы, катализируя перенос ацильных групп из sn-2 позиции холестерина молока, что приводит к образованию лизо-фосфолипидов и сложных эфиров. Эти лизофосфолипиды имеют высокую поверхностную активность, что приводит к уменьшению количества продуктов тепловой обработки молока (карамелизированных белков) на стенках емкостей, то есть, к уменьшению затрат на их очистку (Берестова et al., 2014).

Обработка яичного желтка

Эмульсии составляют отдельный класс дисперсных систем, образованных из двух несмешивающихся жидкостей, одна из которых распределена в другой в виде мельчайших капелек. В зависимости от того, какая фаза находится в диспергированном состоянии, различают прямую (масло-вода) и обратную (вода-масло) эмульсии. По концентрации дисперсной фазы эмульсии подразделяют на разбавленные, концентрированные и высококонцентрированные. Желток яйца является хорошим эмульгатором. Эмульгирующую способность, а, следовательно, и потребительские свойства, можно увеличить, предварительно обрабатывая его препаратами фосфолипазы А2 (Karray et al., 2012).

Химозин и варианты его постепенного улучшения

Химозин — аспартатная эндопептидаза, которая катализирует расщепление пептидной связи Phe105-Met106 к-казеина. Химозин является основной частью ферментного комплекса сычуга и на протяжении тысячелетий используется в сыродельной промышленности. Долгое время его получали натуральным образом из сычуга молодых телят, которые измельчали и промывали солью. Полученная таким образом смесь ферментов на 70 % состоит из химозина и на 30 % из пепсина (Kumar et al., 2010).

Впервые промышленная методика очистки химозина была представлена в 1874 году Кристианом Хансеном. С тех пор химозин стал одним из наиболее охарактеризованных белков. В 90-х годах были разработаны методики производства рекомбинантного химозина быка с использованием грибов Aspergillus niger и дрожжей *Kluyveromyces lactis* (Bodie et al., 1994). Хотя для производства используется генетически модифицированный организм, в конечном продукте сыроделия отсутствует чужеродный генетический материал. Доля рекомбинантного химозина в мировом производстве продолжает расти (Kumar et al., 2010).

С 2004 года ведется интенсивная работа над улучшением физико-химических свойств рекомбинантного химозина методами рациональной белковой инженерии. Широкое применение нашел рекомбинантный химозин верблюда, отличающийся повышенной термостабильностью и специфичностью к к-казеину (Kappeler et al., 2006). На основе этого химозина были разработаны еще более специфичные и стабильные его варианты (Jaeckel et al., 2016; Пушкарев et al., 2023).

Трансглутаминаза

Ещё одним направлением применения рекомбинантных ферментов для нужд пищевой промышленности — использование ферментов для процессинга мяса: с одной стороны тендеризация мясного сырья (проводится при помощи папаина и других протеаз) (Махова et al., 2019), с другой — использование сшивающих агентов для формирования цельных полимерных структур. Для этого используется трансглутаминаза (Abril et al., 2023).

Трансглутаминаза принадлежит к классу аминотрансфераз и катализирует реакцию переаминирования, перенос ацильных групп между γ-карбоксиамидной группой с формированием пептидной связи между боковыми цепями глутамина и различными первичными аминами. ε-амино группы лизиновых оснований приводят к формированию *ε-N-(γ* –глутамил)-лизиновых связей. Трансглутаминаза встречается в различных эукариотах и прокариотах, включая трансглутаминазу mTG из *Streptomyces sp.* (Martins et al., 2014).

Японцы с XII века использовали рыбную массу для формирования рыбных палочек — сурими. Эта рыбная масса содержит природную трансглутаминазу, формирование сурими считается классическим способом использования трансглутаминазы в пищевой промышленности (Petcharat & Benjakul, 2018). Однако с течением времени её стали шире использовать в пищевой промышленности. Сегодня трансглутаминаза используется для улучшения текстуры мяса, молочных продуктов, текстуры и эластичности конфет, в хлебобулочной промышленности для эмульгации глютена (Багрянцева et al., 2021).

Начиная с 2010 года появляется всё больше и больше информации о потенциальном вреде использования трансглутаминазы в хлебобулочной промышленности. Так, её использование увеличивает иммуногенность глютена, и, по всей видимости, приводит к развитию аутоиммунных заболеваний, цеакилии (Lerner & Benzvi, 2021).

Микробная трансглутаминаза разрешена для использования в США (разрешение FDA от 2002 года), в Европейском Союзе (EU Regulation No 1169/2011 dated 25 October 2011 с уведомлением на этикетке, что продукт «сформирован, реструктурирован») (Lerner & Benzvi, 2021). В соответствии с техническим регламентом ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» трансглутаминаза не разрешена на территории ЕАЭС[1].

Однако, ежегодно в РФ ввозится 600 тонн препарата микробной трансглутаминазы[2]. Этот фермент встречается в российских продуктах (по данным Роспотребнадзора), он используется в пищевом производстве, но при этом утвержденных и аккредитованных методик определения активности в конечном продукте нет.

Использование белков в качестве вкусовых добавок

Начиная с 2010-ых гг. появились идеи о возможном использовании белков в качестве пищевых добавок, меняющих вкус. Более всех из них привлекают внимание так называемые сладкие белки (Joseph et al., 2019). В группу сладких белков относят небольшие белки размером в 6–22 кДа растительного происхождения, впервые обнаруженные в 70-х годах: тауматин, монелин, браззеин, пентадин, мабинлин, куркулин (Таблица 6).

Тауматин был охарактеризован первым из плодов дерева катемфе *(Thaumattococcus danielli)*. Использование природного натурального тауматина началось в 1970-х годах для изготовления подсластителя. Наибольших успехов удалось добиться при экспрессии рекомбинантного тауматина в метилотрофных дрожжах *P. pastoris* (Healey et al., 2017). На текущий момент рекомбинантный тауматин разрешен в США в качестве искусственного подсластителя в мороженном, жевательной резинке, еде для животных и прочих продуктах (Kelada et al., 2021). Браззеин обладает меньшим размером, что делает его более удобным объектом для рекомбинантной продукции (Bilal et al., 2022). Кроме того, показан ряд замен, позволяющих усилить сладкий вкус браззеина в 18 раз (H31R, E36D, E41A) (Lee et al., 2013).

Получает распространение и использование рекомбинантного миоглобина для того, чтобы придать вкус говяжьего мяса для искусственного мясного продукта, основанного на растительных белках сои и гороха (Yu et al., 2023). Компания Impossible Foods производит миогло-

[1] Совет Евразийской экономической комиссии. (2014, September 18). *Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств*. https://docs.cntd.ru/document/902359401

[2] *Трансглютаминазация* России. 13-й фактор. (2016, August 29). https://sfera.fm/articles/myasnaya/transglyutaminazatsiya-rossii.-13-i-faktor

Таблица 6

Критерии отбора источников

Белок	Природный источник	Длина пептида в аминокислотных остатках	Относительная сладость, относительно сахарозы	Легальный статус FDA/EFSA	Использование
Тауматин 22 кДа	*Thaumatococcus danielli Benth* (Катемфе) (фрукты) Западная Африка	Одна полипептидная цепь из 207 аминокислотных остатков с восемью внутримолекулярными дисульфидными связями (мономер)	1,600 x	Утвержден в 2018 г. в качестве подсластителя. В 2020 г.: одобрен в качестве подсластителя и усилителя/ модификатора вкуса.	Усилитель вкуса в пищевых продуктах, таких как мороженое, жевательная резинка, молочные продукты, корма для домашних животных, безалкогольные напитки, а также для маскировки нежелательного вкуса в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах (Kelada et al., 2021).
Монеллин 10,7 кДа	*Dioscoreophyllum Cumminsii diels* (ягода Серендипити) (фрукты) / Западная Африка	Две полипептидные цепи: цепь А содержит 44 аминокислотных остатка, цепь В — 50 аминокислотных остатка (димер А+В).	3,000	Нет юридического статуса в США (FDA или EFSA)	Не используется в пищевой промышленности из-за низкой стабильности при нагревании и кислой среде
Браззейн 6,4 кДа	*Pentadiplandra brazzeana* (фрукты) / Западная Африка	Одна цепь из 54 аминокислотных остатков с восемью дисульфидными связями (мономер)	500–2,000 x	Может использоваться в качестве усилителя вкуса напитков с лимонной кислотой для уменьшения побочного привкуса других подсластителей, таких как стевиозид, ацесульфам -К и аспартам.	Нужно больше исследований, чтобы улучшить вкусовое восприятие
Мабинлин 12,3 кДа	*Capparis masaki* (китайское растение) (лист и цветок)	Две полипептидных цепи: цепь А, состоящая из 33 аминокислотных остатка, цепь Б, состоящая из 72 аминокислотных остатка (димер А + В).	400 x	Не одобрено	
Пентадин 12 кДа	*Pentadiplandra brazzeana* (фрукты) Африка	Нет данных	500 x	Не одобрено	Модификатор вкуса; можно использовать с сахарином, чтобы замаскировать неприятный горький привкус.

Примечание. Адаптировано из Farag et al. (2022).

бин и гем-содержащие рекомбинантные белки в дрожжах *P. pastoris* (Roy-Chaudhuris & Shankar, 2020). Применение данной технологии одобрено FDA.

Не исключено появления новых вкусовых сочетаний и усилителей вкуса, основанных на новых рекомбинантных белках и пептидах.

Белки-аналоги основных продуктов. Прецизионная ферментация

Существует серьезная проблема в производстве современных пищевых продуктов, содержащих животные белки. В 2022 году население нашей планеты достигло 8 млрд. человек и продолжает быстро расти. По прогнозам ООН, к 2050 году на Земле будут жить уже 9,7 млрд. человек[1]. Однако, чем больше население планеты, тем больше каче-

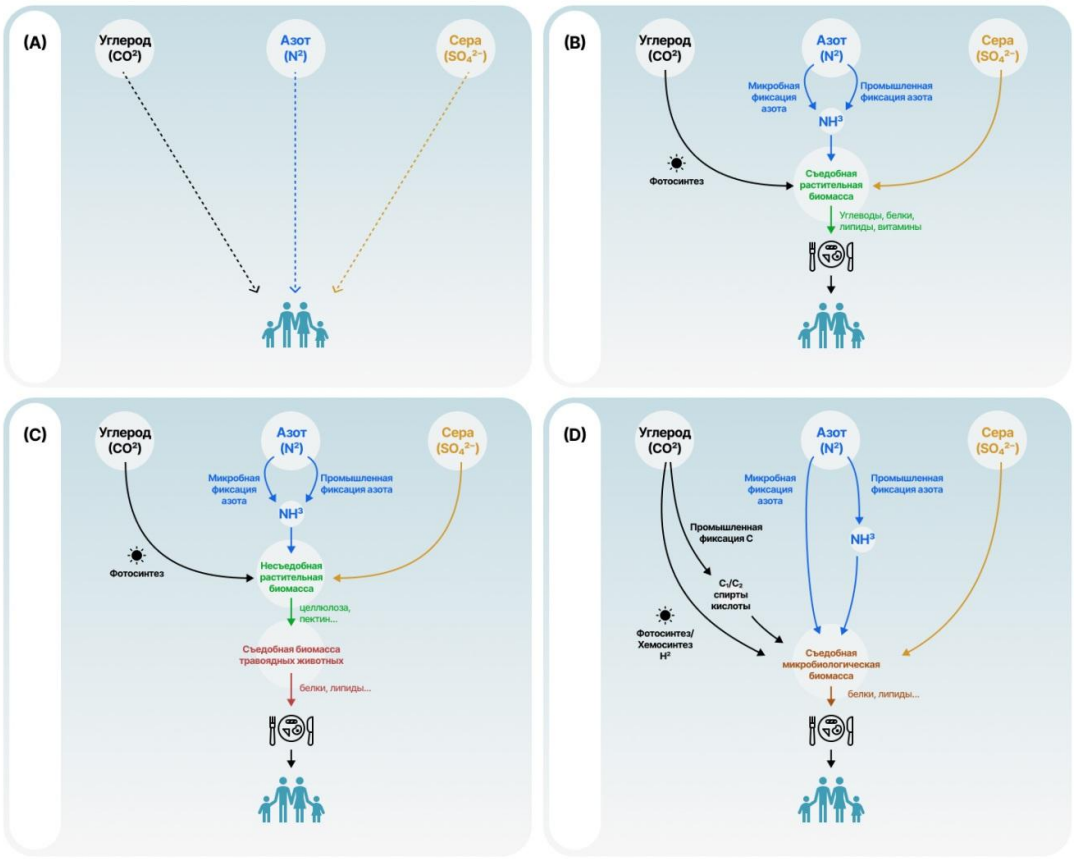
[1] https://www.un.org/en/global-issues/population#:~:text=Our %20growing %20population&text=The %20world's %20population %20is %20expected,billion %20in %20the %20mid %2D2080s.

ственной пищи необходимо производить. Человечество постепенно оказываемся в «экологической ловушке» — не хватает пахотных земель, но увеличение агропромышленного комплекса приводит к тому, что в атмосферу и в почву попадает все больше вредных веществ. А они в свою очередь не менее опасны для человека, чем голод. Пищевая промышленность ответственна за треть парниковых выбросов в атмосферу (Crippa et al., 2021). При этом индустрия производства животного белка требует использования 77 % пахотных земель при продукции 38 % пищевого белка[1].

Какие же технические решения позволят добиться устойчивого развития в пищевом производстве? Фуллер определяет эфемерализацию как способность технологического прогресса делать всё больше и больше всё меньшими средствами, за счёт введения новых технологий, которые позволяют получать больше отдачи (продукта, услуги, информации) с затратой всё меньшего и меньшего количества исходных ресурсов (усилий, времени, материалов и т.д.) (Fuller, 1973). Эфемерализация в области пищевой биотехнологии сталкивается с проблемой получения недорого животного белка с наименьшими затратами по энергии и антропогенной нагрузке (Linder, 2019). Использование специально сконструированных микроорганизмов для продукции рекомбинантного животного белка — один из потенциальных вариантов снизить антропогенное давление на нашу планету (Рисунок 6).

Рисунок 6

Биокаталитический взгляд на производство продуктов питания и питание человека



Примечание. (A) У людей отсутствует метаболическая способность усваивать наиболее часто встречающиеся в природе неорганические формы углерода (диоксид углерода, CO2), азота (газообразный азот, N2) и серы (сульфат, SO42–). (Б) Съедобные растения позволяют людям косвенно приобретать неорганический углерод, азот и серу. (C) Травоядные животные позволяют людям через посредников получать доступ к питательным веществам из несъедобной биомассы. (D) Съедобная микробная биомасса позволяет людям приобретать неорганический углерод, азот и серу, но без абсолютной потребности в фотосинтезе. Адаптировано из Linder (2023).

[1] Mridul A. (2023, September 5). 8 Charts That Illustrate the Impact of Food Systems and Our Diets on Climate Change. https://www.greenqueen.com.hk/stats-charts-facts-climate-change-impact-food-systems-diet-agricultu/].

Термин «прецизионная ферментация» появился исторически недавно, он описывает процесс биопродукции целевого рекомбинантного белка (или другого биосинтетического продукта) спроектированным микроорганизмом с последующей очисткой для пищевого потребления. Использование этого процесса позволяет сильно сократить потребление водных, энергетических ресурсов и снизить выбросы CO_2 и CH_4 при продукции данных белков (Рисунок 7).

Основные технологии производства рекомбинантного белка для питания (Таблица 7) на данный момент сфокусированы на нескольких белках: овальбумине – основном белке куриного яйца; и основных белках молока β-лактоглобулине, α-,β-,κ- казеинах (Hoppenreijs et al., 2024).

Биопродукция рекомбинантного овальбумина в грибах *T. reesei* позволяет получать овальбумин с меньшей нагрузкой на окружающую среду в метриках LCA (life cycle assessment, или оценка жизненного цикла) и GWP (потенциала глобального потепления) (Järviö et al., 2021). Такая же оценка проведена для рекомбинантного β-лактоглобулина, основного белка сыворотки молока, производимого в *T. reesei* компанией Perfect Day (Рисунок 8) (Geistlinger et al., 2018, 2020). Для производства в грибах *T. reesei* компания имеет разрешение от FDA на производство β-лактоглобулина и его использование в продуктах питания. Рекомбинантный β-лактоглобулин используется в пищевой промышленности широко в качестве добавок в молочные продукты (мороженное, питательные батончики и др.).

Основной конкурент компании Perfect Day — израильская компания Remilk. Помимо рекомбинантного β-лактоглобулина компания производит рекомбинантные казеины по отдельности, очищает их, а затем собирает в казеиновые мицеллы (Wolff et al., 2022). Рекомбинантный β-лактоглобулин производится в метилотрофных

Рисунок 7

Биокаталитический взгляд на производство продуктов питания и питание человека

Таблица 7

Примеры продуктов «Прецизионной ферментации»

Компания	Продукт	Источник углерода
EVERY Company	Различные белки куриного яйца	углеводы
Liven proteins	Желатин, коллаген	углеводы
New Culture	Белки молока, казеины	углеводы
OnegoBio	Куриный овальбумин	углеводы
PerfectDay	β-лактоглобулин,	глюкоза
Remilk	Белки молока, β-лактоглобулин, казеины	Метанол, глюкоза
Better Whey («Nestle»)	β-лактоглобулин	неизвестно
TurtleTree	Лактоферрин	неизвестно

Рисунок 8

Оценка уровня потребности ПГП (CO_2/кг белка) при производстве рекомбинантного и натурального β-лактоглобулина

Примечание. Perfect Day, Inc. (2021, August 20)[1]

дрожжах *Pichia pastoris* yRMK-66[2]. Источником углерода для такого производства может являться как метанол, так и глюкоза, конечный продукт не содержит генетического материала хозяина и уже применяется в пищевой промышленности (соответствует GRAS). Таким образом, удается получить безлактозное молоко с полностью рекомбинантными белками (Wolff et al., 2022). Использование различных казеинов позволяет получать гипоаллергенное молоко для людей с аллергией на конкретный белок из казеина (Bhatt V. et al., 2021). Помимо рекомбинантного молока также получают сыр моцареллу (Antuma et al., 2024). На конец 2023 года компания получила разрешение на выход на рынок США, Канады и Израиля. Использование дрожжей при производстве рекомбинантного β-лактоглобулина по словам руководства компании позволяет сократить GWP на 97 %, а так же снизить потребление энергии и воды, необходимое для производства белка[3] (Behm et al., 2022) (Рисунок 8).

Проблема трансфера пищевых биотехнологий в Российской Федерации

На территории РФ действует несколько регламентирующих актов в отношении рекомбинантных ферментов. Отдельные ГОСТы действуют на ферментные препараты для пищевой промышленности. Однако эти ГОСТы не распространяются на весь список перечисленных выше препаратов, а только на амилазы , молокосвертывающие ферменты[4], липазы[5]. Остальные препараты (глюкооксидаза, каталаза, трансглутаминаза и др.) находятся в обороте без государственных стандартов, нет единого закона, регламентирующего список разрешенных ферментных препаратов для пищевой промышленности (Кулев, 2014).

Основной закон, который регламентирует требования к ферментному препарату для пищевой промышленности — технический регламент ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и тех-

[1] Perfect Day, Inc. (2021, August 20). Comparative life cycle assessment of Perfect Day whey protein production to dairy protein. https://perfectday.com/wp-content/uploads/2022/01/Comparative-Perfect-Day-Whey-LCA-report-prepared-by-WSP_20AUG2021_Non-Confidential-1.pdf

[2] Sylvester,Brian P. (2022, March 4). GRAS Notice for Non-Animal P-Lactoglobulin Whey Protein from Fermentation by Komagataella phaffi. https://www.fda.gov/media/168464/download

[3] Perfect Day, Inc. (2021, August 20). Comparative life cycle assessment of Perfect Day whey protein production to dairy protein. https://perfectday.com/wp-content/uploads/2022/01/Comparative-Perfect-Day-Whey-LCA-report-prepared-by-WSP_20AUG2021_Non-Confidential-1.pdf

[4] ГОСТ 34353–2017. Препараты ферментные молокосвертывающие животного происхождения сухие. (2018, September 1). https://docs.cntd.ru/document/1200157890

[5] ГОСТ Р 71139–2023 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения липолитической активности. (2024, January 3).

нологических вспомогательных средств»[1]. Несмотря на множественные попытки гармонизировать этот закон под текущее состояние рынка пищевых ферментов, данный закон устарел и не отражает современного разнообразия рекомбинантных ферментов и технологических платформ, используемых для их продукции (Алешков & Каленик 2017; Багрянцева et al., 2016; 2021; Кулев, 2014; Хасанова & Тешаев, 2020).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволили выявить усилившийся интерес исследователей к рациональному дизайну рекомбинантных ферментов с измененными каталитическими свойствами (Boukid et al., 2023; Li et al., 2024). Речь идет не только о улучшении непосредственной скорости катализа субстратного превращения ферментом, но и улучшении термостабильности рекомбинантного фермента (Cramer et al., 2018; Jin et al., 2023; Zhu et al., 2023), снижения неспецифической активности (Jaeckel et al., 2019). Шире стали применяться методы системного анализа с использованием моделей машинного обучения для рационального дизайна структуры фермента (Anishchenko et al., 2021).

Выделяется тенденция на использование более высокопроизводительных систем, экспрессирующих рекомбинантные белки, созданных методами геномного редактирования (Li et al., 2022; Salazar-Cerezo et al., 2023; Yang et al., 2024), метаболической инженерии (Meyer, 2021; Peña et al., 2018; Zhang et al., 2023) и с оптимизированным биопроцессом продукции рекомбинантного белка (Fasim et al., 2021; Mayolo-Deloisa et al., 2020; Saad et al., 2023; Yuan et al., 2024). Использование для биопродукции целевых белков GRAS-микроорганизмов облегчает регуляторное сопровождение для выхода таких продуктов на рынок (Augustin et al., 2023). При этом новые технологии биопродукции оптимизированных ферментов делают старые технологии производства ферментов неконкурентоспособными, так как для производства эквивалентного количества белка требуется меньше материала, энергии и персонала.

Появилось новое направление — прецизионная ферментация для продукции рекомбинантных белков для пищевого производства (Augustin et al., 2023; Teng et al., 2021). В данных работах авторы фокусируются как и на объектах для рекомбинантной экспрессии, так и на системах для экспрессии рекомбинантных продуктов, аспектах связанных с масштабируемой очисткой полученного продукта (Amorim et al., 2021). Приводятся оценки по себестоимости отдельных рекомбинантных продуктов (Hettinga & Bijl, 2022), а так же технико-экономический анализ удельной экологической нагрузки прецизионной ферментации по сравнению с традиционным производством (Behm et al., 2022).

В Российской Федерации в настоящее время нет нормативной базы для производства многих ферментов, применяемых в пищевой индустрии, поскольку технический регламент ТС 029/2012 регулирует список разрешенных продуцентов и самих рекомбинантных белков. Это позволяет существовать парадоксальной ситуации, когда пищевые рекомбинантные ферменты в России нельзя производить, но можно покупать и использовать зарубежные ферменты. Поскольку отличить рекомбинантный фермент от натурального практически невозможно, производство рекомбинантных ферментов в Российской Федерации и странах Евразийского экономического союза оказывается вне закона из-за несовершенства законодательства[2]. Технологическое развитие в области биотехнологии указывает на то, что данная отрасль будет иметь мощное развитие в ближайшее время вплоть до 2040 года[3].

В России не все экспрессирующие платформы для продукции рекомбинантных ферментов, произведенные на территории США и ЕС как GRAS (Generally recognized as safe — «общепризнанно как безопасно»), разрешены для использования (Багрянцева, 2020). Так некоторые метилотрофные дрожжи (*P. pastoris, Hansenula polymorpha, Yarrowia lipolytica*) не разрешены в качестве производящих платформ для пищевой продукции.

[1] Совет Евразийской экономической комиссии. (2014, September 18). Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств. https://docs.cntd.ru/document/902359401

[2] Проблема отличия натурального фермента от рекомбинантного, методы выявления и контроля примесей генетических материалов штамма-продуцента — тема отдельного обзора, необходимо рассматривать данную тему за пределами данного обзора. Более подробно данная тематика освящена (Lensch et al., 2022), (Sutay Kocabaş & Grumet, 2019).

[3] McKinsey Global Institute (2020, May 13) The Bio Revolution Innovations transforming economies, societies, and our lives. https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/the-bio-revolution-innovations-transforming-economies-societies-and-our-lives

Кроме того, по законодательству РФ требования к чистоте для рекомбинантных ферментов, применяемых в пищевой промышленности, приравниваются к требованиям, принятым для рекомбинантных медицинских белков[1]. Вследствие этого, производителям рекомбинантных ферментов для пищевой промышленности приходится соблюдать необоснованно завышенные требования к чистоте выпускаемых препаратов и к производственным мощностям, что делает производство ферментов неконкурентным.

Необходим закон разрешительного характера, который позволит производить отечественные рекомбинантные белки, не нарушая российского законодательства, с использованием всей мощи современных генетических технологий и с использованием разнообразных современных экспрессионных платформ. Только этот подход позволит производить конкурентные пищевые продукты в XXI веке в достаточном количестве и отвечающим всем нормативным нормам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная биотехнология — синоним эффективного применения ферментативного катализа во многих отраслях пищевой промышленности. Данный обзор отражает использование рекомбинантных белков и ферментов в современной пищевой промышленности. Подробно охарактеризовано использование амилаз, молокосвертывающих ферментов, липаз и трансглутаминазы в пищевой промышленности. Для области использования прочих ферментов (таких как глюкозооксидаза, каталаза, β-глюкозидаза и других) в пищевой промышленности даны общие сведения, более детальный анализ требует отдельного рассмотрения. Вследствие большого числа научных исследований, обзор ограничивается областью исследования биопродукции рекомбинантных белков для пищевой промышленности, однако, область биопродукции витаминов, красителей и липидов методами прецизионной ферментации для пищевой промышленности осталось вне поля данного обзора. Полученные результаты могут быть использованы для анализа направлений развития прикладной биотехнологии в области создания эффективных рекомбинантных белков и их регулирования в правовом поле. Существует потребность в появлении более эффективных исследований и разработок в области производства рекомбинантных пищевых белков. Существует необходимость в приведении нормативных правовых актов России в области пищевого производства в соответствии с новыми технологическими возможностями.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Филькин Сергей Юрьевич: концептуализация, разработка методологии исследования, работа с программным обеспечением, администрирование данных, написание - подготовка черновика рукописи.

Липкин Алексей Валерьевич: курирование данных, разработка методологии исследования, написание - рецензирование и редактирование рукописи.

Федоров Алексей Николаевич: концептуализация, научное руководство исследованием, визуализация, написание - рецензирование иредактирование рукописи

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Алексеенко, А. В., & Предыбайло, А. В. (2008). Переэтерификация масел и жиров. *Молочная промышленность, 11*, 24–24.

Alekseenko, A. V., & Predybaylo, A. V. (2008). Transesterification of oils and fats. *Dairy Industry, 11,* 24–24. (In Russ.)

Алешков, А. В., & Каленик, Т. К. (2017). Техническое регулирование инновационной пищевой продукции. *Известия Дальневосточного федерального университета. Экономика и управление, 1*(81), 102–112.

Aleshov, A. V., & Kalenik, T. K. (2017). Technical regulation of innovative food products. *The Bulletin of the Far Eastern Federal University. Economics and Management, 1*(81), 102–112. (In Russ.)

[1] Государственный стандарт качества лекарственного средства. Общая фармакопейная статья ОФС 42- «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» https://base.garant.ru/70457452/5c69d3b8fce87cf1b2bd234a0868ed8c/

Багрянцева, О. В. (2020). Обоснование необходимости разработки мероприятий по управлению рисками, связанными с использованием пищевой продукции, производимой при помощи микробного синтеза. *Вопросы питания, 89*(2), 64–76. https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10017

Bagryantseva, O. V. (2020). Justification for the development of measures to manage risks associated with the use of food products produced by microbial synthesis. *Problems of Nutrition, 89*(2), 64–76. (In Russ.) https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10017

Багрянцева, О. В., Гмошинский, И. В., Шипелин, В. А., Цурикова, Н. В., Шевелева, С. А., Шумакова, А. А., Мусаева, А. Д., Трушина, Э. Н., Мустафина, О. К., Сото, С. Х., Минаева, Л. П., Седова, И. Б., Селифанов, А. В., Соколов, И. Е., Колобанов, А. И., & Хотимченко, С. А. (2021). Оценка рисков для здоровья ферментного препарата - комплекса глюкоамилазы и ксиланазы из Aspergillus awamori XYL T-15. *Вопросы питания, 90*(3), 28–39. https://doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-3-42-52

Bagryantseva, O. V., Gmoshinsky, I. V., Shipelin, V. A., Tsurikova, N. V., Sheveleva, S. A., Shumakova, A. A., Musaev, A. D., Trushina, E. N., Mustafina, O. K., Soto, S. Kh., Minaeva, L. P., Sedova, I. B., Selifanov, A. V., Sokolov, I. E., Kolobanov, A. I., & Khotimchenko, S. A. (2021). Health risk assessment of the enzyme preparation - a complex of glucoamylase and xylanase from Aspergillus awamori XYL T-15. *Problems of Nutrition, 90*(3), 28–39. (In Russ.) https://doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-3-42-52

Багрянцева, О. В., Хотимченко, С. А., Шевелева, С. А., Минаева, Л. П., & Семенова, П. А. (2021). Об использовании фермента трансглютаминазы в пищевой промышленности. П*ищевая промышленность, 10*, 78–81.

Bagryantseva, O. V., Khotimchenko, S. A., Sheveleva, S. A., Minaeva, L. P., & Semenova, P. A. (2021). On the use of the enzyme transglutaminase in the food industry. *Food Industry, 10*, 78–81. (In Russ.)

Багрянцева, О. В., Шатров, Г. Н., & Арнаутов, О. В. (2016). Вопросы безопасного использования ферментных препаратов, пищевых добавок и ароматизаторов, полученных методом биотехнологии. *Пищевая промышленность, 6*, 69–73.

Bagryantseva, O. V., Shatrov, G. N., & Arnautov, O. V. (2016). Issues of safe use of enzyme preparations, food additives, and flavors obtained by biotechnology. *Food Industry, 6*, 69–73. (In Russ.)

Берестова, А. В., Зинюхин, Г. Б., & Межуева, Л. В. (2014). Особенности технологии пищевых масложировых эмульсий функционального назначения. *Вестник Оренбургского государственного университета, 1*(162), 150–155.

Berestova, A. V., Zinyukhin, G. B., & Mezhuyeva, L. V. (2014). Features of the technology of functional food fat emulsions. *Vestnik of the Orenburg State University, 1*(162), 150–155. (In Russ.)

Кулев, Д. Х. (2014). Техническое регулирование пищевых ингредиентов на едином экономическом пространстве. *Контроль качества продукции, 9,* 27–34.

Kulev, D. H. (2014). Technical regulation of food ingredients in the single economic space. *Product Quality Control, 9*, 27–34. (In Russ.)

Махова, А. А., Минаев, М. Ю., Куликовский, А. В., & Вострикова, Н. Л. (2019). Изучение ферментативной активности рекомбинантной металлопептидазы, предназначенной для применения в мясной промышленности. В*опросы питания, 88*(4), 95–104. https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10047

Makhova, A. A., Minaev, M. Yu., Kulikovsky, A. V., & Vostrikova, N. L. (2019). Study of the enzymatic activity of a recombinant metallopeptidase intended for use in the meat industry. *roblems of Nutrition*, *88*(4), 95–104. (In Russ.) https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10047

Пушкарев, В. А., Мусина, О. Н., Беленькая, С. В., Щербаков, Д. Н., Коваль, А. Д., Белов, А. Н., & Ельчанинов, В. В. (2023). Термостабильность и параметры кинетики Михаэлиса-Ментен инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (Rangifer tarandus). *Сыроделие и маслоделие, 3,* 42–44.

Pushkarev, V. A., Musina, O. N., Belenkaya, S. V., Shcherbakov, D. N., Koval, A. D., Belov, A. N., & Elchaninov, V. V. (2023). Thermostability and Michaelis-Menten kinetics parameters of the engineered recombinant chymosin variant from reindeer (Rangifer tarandus). *Cheesemaking and Buttermaking, 3,* 42-44. (In Russ.) https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-3-42-44

Хасанова, Д. А., & Тешаев, Ш. Ж. (2020). Воздействие генно-модифицированных продуктов на человеческий организм. *Биология и интегративная медицина, 5*(45), 5–19.

Khasanova, D. A., & Teshaev, Sh. Zh. (2020). The impact of genetically modified products on the human body. *Biology and Integrative Medicine, 5*(45), 5-19

Abril, B., Bou, R., García-Pérez, J. V., & Benedito, J. (2023). Role of enzymatic reactions in meat processing and use of emerging technologies for process intensification. *Foods*, *12*(10). https://doi.org/10.3390/foods12101940

Aider, M. (2021). Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. *JDS Communications, 2*(5), 233–237. https://doi.org/10.3168/jdsc.2020–0073

Amorim, M. L., Soares, J., Coimbra, J. S. D. R., Leite, M. de O., Albino, L. F. T., & Martins, M. A. (2021). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(12), 1976–2002. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046

Anishchenko, I., Pellock, S. J., Chidyausiku, T. M., Ramelot, T. A., Ovchinnikov, S., Hao, J., Bafna, K., Norn, C., Kang, A., Bera, A. K., DiMaio, F., Carter, L., Chow, C. M., Montelione, G. T., & Baker, D. (2021). *De novo protein design by deep network hallucination. Nature, 600*(7889), 547–552. https://doi.org/10.1038/s41586–021-04184-w

Antuma, L. J., Braitmaier, S. H., Garamus, V. M., Hinrichs, J., Boom, R. M., & Keppler, J. K. (2024). Engineering artificial casein micelles for future food: Preparation rate and coagulation properties. *Journal of Food Engineering*, *366*, 111868. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111868

Ardö, Y. (2021). Enzymes in Cheese Ripening. In A. L. Kelly & L. B. Larsen (Eds.), *Agents of change: Enzymes in milk and dairy products* (pp. 363–395). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978–3-030–55482-8_15

Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology, 98*(17), 7283–7297. https://doi.org/10.1007/s00253–014-5889-y

Ashok, P. P., Dasgupta, D., Ray, A., & Suman, S. K. (2023). Challenges and prospects of microbial α-amylases for industrial application: a review. *World Journal of Microbiology & Biotechnology, 40*(2), 44. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03821-y

Augustin, M. A., Hartley, C. J., Maloney, G., & Tyndall, S. (2023). Innovation in precision fermentation for food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–21. https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2166014

Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Production of Biopharmaceuticals in *E. coli:* Current Scenario and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 25*(7), 953–962. https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079

Ballinger, R. A. (1978). *A history of sugar marketing through 1974. Agricultural Economic Report No. 382*. USDA. https://doi.org/10.22004/ag.econ.307665

Bankefa, O. E., Samuel-Osamoka, F. C., & Oladeji, S. J. (2022). Improved enzyme production on corncob hydrolysate by a xylose-evolved Pichia pastoris cell factory. *Journal of Food Science and Technology, 59*(4), 1280–1287. https://doi.org/10.1007/s13197–021-05135-z

Bayless, T. M., Brown, E., & Paige, D. M. (2017). Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Current Gastroenterology Reports, 19*(5), 23. https://doi.org/10.1007/s11894–017-0558–9

Behm, K., Nappa, M., Aro, N., Welman, A., Ledgard, S., Suomalainen, M., & Hill, J. (2022). Comparison of carbon footprint and water scarcity footprint of milk protein produced by cellular agriculture and the dairy industry. *The International Journal of Life Cycle Assessment, 27*(8), 1017–1034. https://doi.org/10.1007/s11367-022-02087-0

Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.-H., & Schmid, R. D. (2003). Directed evolution of a bacterial alpha-amylase: toward enhanced pH-performance and higher specific activity. *Protein Science: A Publication of the Protein Society, 12*(10), 2141–2149. https://doi.org/10.1110/ps.0384403

Bhatt, V., Clark, L., Geistlinger, T., & Linn, J. (2023). *Hypoallergenic recombinant milk proteins and compositions comprising the same* (Perfect Day, Inc. Patent). https://patentimages.storage.googleapis.com/ef/bd/15/c34624546b16d5/US20230106635A1.pdf

Bhosale, S. H., Rao, M. B., & Deshpande, V. V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological Reviews, 60*(2), 280–300. https://doi.org/10.1128/mr.60.2.280–300.1996

Bilal, M., Ji, L., Xu, S., Zhang, Y., Iqbal, H. M. N., & Cheng, H. (2022). Bioprospecting and biotechnological insights into sweet-tasting proteins by microbial hosts-a review. *Bioengineered, 13*(4), 9815–9828. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061147

Bodie, E. A., Armstrong, G. L., & Dunn-Coleman, N. S. (1994). Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger var. awamori* using parasexual recombination. *Enzyme and Microbial Technology, 16*(5), 376–382. https://doi.org/10.1016/0141–0229(94)90151–1

Borrelli, G., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences, 16*(9), 20774–20840. https://doi.org/10.3390/ijms160920774

Boukid, F., Ganeshan, S., Wang, Y., Tülbek, M. Ç., & Nickerson, M. T. (2023). Bioengineered enzymes and precision fermentation in the food industry. *International Journal of Molecular Sciences, 24*(12). https://doi.org/10.3390/ijms241210156

Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition, 79*(4), 537–543. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537

Cairns, T. C., Nai, C., & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biology and Biotechnology*, *5*, 13. https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5

Casado, V., Martín, D., Torres, C., & Reglero, G. (2012). Phospholipases in food industry: A review. In *Lipases and Phospholipases* (pp. 495–523). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_29

Casey, J. P. (1976). High fructose corn syrup. A case history of Innovation. *Starch*, 29, 196-204. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/star.19770290605

Cramer, J. F., Kolkman, M. A. B., Ma, Z., Scheffers, M., Shipovskov, S., Van Brussel-Z, M., & Yu, S. (2018). *Methods of using thermostable serine proteases* (Dupont Nutrition Biosciences APC Patent). https://patentimages.storage.googleapis.com/9a/9c/63/f6766beb736a76/WO2018118815A1.pdf.

Crippa, M., Solazzo, E., Guizzardi, D., Monforti-Ferrario, F., Tubiello, F. N., & Leip, A. (2021). Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions. *Nature Food, 2*(3), 198–209. https://doi.org/10.1038/s43016-021-00225-9

Crowell, L. E., Goodwine, C., Holt, C. S., Rocha, L., Vega, C., Rodriguez, S. A., Dalvie, N. C., Tracey, M. K., Puntel, M., Wigdorovitz, A., Parreño, V., Love, K. R., Cramer, S. M., & Love, J. C. (2021). Development of a platform process for the production and purification of single-domain antibodies. *Biotechnology and Bioengineering, 118*(9), 3348–3358. https://doi.org/10.1002/bit.27724

Dahiya, S., Bajaj, B. K., Kumar, A., Tiwari, S. K., & Singh, B. (2020). A review on biotechnological potential of multifarious enzymes in bread making. *Process Biochemistry, 99*, 290–306. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.002

Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M.-A., & Roosens, N. H. C. (2020). Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods* (Basel, Switzerland), *9*(3). https://doi.org/10.3390/foods9030326

De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, K. M., Svendsen, A., & Patkar, S. (2007). Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology, 74*(2), 290–300. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0775-x

Farag, M. A., Rezk, M. M., Hamdi Elashal, M., El-Araby, M., Khalifa, S. A. M., & El-Seedi, H. R. (2022). An updated multifaceted overview of sweet proteins and dipeptides as sugar substitutes; the chemistry, health benefits, gut interactions, and safety. *Food Research International*, *162*(Pt A), 111853. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111853

Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α-amylase: a review. *Archives of Microbiology, 203*(4), 1281–1292. https://doi.org/10.1007/s00203–020-02128-y

Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, *69*, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002

Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Research*, 2010, 862537. https://doi.org/10.4061/2010/862537

Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology, 68,* 91–101. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017

Filkin, S. Y., Lipkin, A. V., & Fedorov, A. N. (2020). Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications. Biochemistry. *Biokhimiia, 85*(Suppl 1), S177–S195. https://doi.org/10.1134/S0006297920140096

Fraatz, M. A., Rühl, M., & Zorn, H. (2014). Food and feed enzymes. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, *143*, 229–256. https://doi.org/10.1007/10_2013_235

Fuller, R.B. (1973). *Nine chains to the moon* (pp. 252–259). Philadelphia: Anchor Books.

Geistlinger T., Jensen H., Jhala R., Meerman, H., Ramesh, B., Wagoner, T., Johnson T. S., Wu V.W.-X., & Manea. F. (2020). *Recombinant components and compositions for use in food products* (Perfect Day Inc. Patent). (https://patents.google.com/patent/WO2018039632A1

Geistlinger T., Jhala R., Krueger K.P., & Ramesh, B. (2018). Food products comprising milk proteins and non-animal proteins, and methods of producing the same (Perfect Day Inc. Patent). https://patents.google.com/patent/CA3034678A1

Glinsmann, W. H., Irausquin, H., & Park, Y. K. (1986). Evaluation of health aspects of sugars contained in carbohydrate sweeteners. Report of sugars task force, 1986. *The Journal of Nutrition, 116*(11 Suppl), S1–S216. https://doi.org/10.1093/jn/116.suppl_11.S1

Healey, R. D., Lebhar, H., Hornung, S., Thordarson, P., & Marquis, C. P. (2017). An improved process for the production of highly purified recombinant thaumatin tagged-variants. *Food Chemistry, 237*, 825–832. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.018

Herrera-Estala, A. L., Fuentes-Garibay, J. A., Guerrero-Olazarán, M., & Viader-Salvadó, J. M. (2022). Low specific growth rate and temperature in fed-batch cultures of a beta-propeller phytase producing Pichia pastoris strain under GAP promoter trigger increased KAR2 and PSA1–1 gene expression yielding enhanced extracellular productivity. *Journal of Biotechnology, 352*, 59–67. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.010

Hettinga, K., & Bijl, E. (2022). Can recombinant milk proteins replace those produced by animals? *Current Opinion in Biotechnology, 75*, 102690. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102690

Hoppenreijs, L. J. G., Annibal, A., Vreeke, G. J. C., Boom, R. M., & Keppler, J. K. (2024). Food proteins from yeast-based precision fermentation: Simple purification of recombinant

β-lactoglobulin using polyphosphate. *Food Research International*, *176*, 113801. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113801

Jaeckel C., Lund M., Hansen E.F., Riisberg L., Jeppesen I., & Van Den Brink J.M. (2016). *Variants of chymosin with improved properties* (Chr. Hansen A/S Patent) .https://patentimages.storage.googleapis.com/c2/ac/60/64bade251bd323/AU2017267273B2

Jaeckel C., Lund M., Hansen E. F., Riisberg L., Jeppesen I., & Van den Brink J.M. (2019). *Variants of chymosin with improved properties* (Chr. Hansen A/S Patent). https://patentimages.storage.googleapis.com/c2/ac/60/64bade251bd323/AU2017267273B2

Järviö, N., Parviainen, T., Maljanen, N.-L., Kobayashi, Y., Kujanpää, L., Ercili-Cura, D., Landowski, C. P., Ryynänen, T., Nordlund, E., & Tuomisto, H. L. (2021). Ovalbumin production using Trichoderma reesei culture and low-carbon energy could mitigate the environmental impacts of chicken-egg-derived ovalbumin. *Nature Food*, *2*(12), 1005–1013. https://doi.org/10.1038/s43016-021-00418-2

Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. *Open Biology, 6*(8). https://doi.org/10.1098/rsob.160196

Jin, L., Wan, Q., Ouyang, S., Zheng, L., Cai, X., Zhang, X., Shen, J., Jia, D., Liu, Z., & Zheng, Y. (2023). Isomerase and epimerase: overview and practical application in production of functional sugars. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 1–16. https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2260888

Joseph, J. A., Akkermans, S., Nimmegeers, P., & Van Impe, J. F. M. (2019). Bioproduction of the recombinant sweet protein thaumatin: Current State of the art and perspectives. *Frontiers in Microbiology, 10*, 695. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00695

Kappeler, S. R., van den Brink, H. J. M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E. B., & Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *342*(2), 647–654. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014

Karray, A., Gargouri, Y., Verger, R., & Bezzine, S. (2012). Phospholipase A2 Purification and Characterization: A Case study. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and protocols* (pp. 283–297). *Humana Press*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_17

Kelada, K. D., Tusé, D., Gleba, Y., McDonald, K. A., & Nandi, S. (2021). Process Simulation and Techno-Economic Analysis of Large-Scale Bioproduction of Sweet Protein Thaumatin II. *Foods*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/foods10040838

Khamies, M., Hagar, M., Kassem, T. S. E., & Moustafa, A. H. E. (2024). Case study of chemical and enzymatic degumming processes in soybean oil production at an industrial plant. *Scientific Reports*, *14*(1), 4064. https://doi.org/10.1038/s41598-024-53865-9

Khootama, A., Putri, D. N., & Hermansyah, H. (2018). Techno-economic analysis of lipase enzyme production from Aspergillus niger using agro-industrial waste by solid state fermentation. In *5th International Conference on Energy and Environment Research*, ICEER (pp. 143–148). IEEE. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.054

Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., & Batish, V. K. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology, 30*(4), 243–258. https://doi.org/10.3109/07388551.2010.483459

Lee, J.-W., Cha, J.-E., Jo, H.-J., & Kong, K.-H. (2013). Multiple mutations of the critical amino acid residues for the sweetness of the sweet-tasting protein, brazzein. *Food Chemistry, 138*(2–3), 1370–1373. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.140

Lerner, A., & Benzvi, C. (2021). Microbial Transglutaminase Is a Very Frequently Used Food Additive and Is a Potential Inducer of Autoimmune/Neurodegenerative Diseases. *Toxics*, *9*(10). https://doi.org/10.3390/toxics9100233

Lilbaek, H. M., Broe, M. L., Høier, E., Fatum, T. M., Ipsen, R., & Sørensen, N. K. (2006). Improving the yield of Mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk. *Journal of Dairy Science, 89*(11), 4114–4125. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72457-2

Linder, T. (2019). Making the case for edible microorganisms as an integral part of a more sustainable and resilient food production system. *Food Security*, *11*(2), 265–278. https://doi.org/10.1007/s12571–019-00912–3

Liu, Q., Xun, G., & Feng, Y. (2019). The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. *Biotechnology Advances*, *37*(4), 530–537. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.011

Liu, X., Lian, M., Zhao, M., & Huang, M. (2024). Advances in recombinant protease production: current state and perspectives. *World Journal of Microbiology & Biotechnology, 40*(5), 144. https://doi.org/10.1007/s11274-024-03957-5

Li, W., Huang, C., & Chen, J. (2022). The application of CRISPR /Cas mediated gene editing in synthetic biology: Challenges and optimizations. F*rontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10*, 890155. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.890155

Li, Y., Zhang, H., Fu, Y., Zhou, Z., Yu, W., Zhou, J., Li, J., Du, G., & Liu, S. (2024). Enhancing Acid Resistance of Aspergillus niger Pectin Lyase through Surface Charge Design for Improved Application in Juice Clarification. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, *72*(20), 11652–11662. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01505

Martins, I. M., Matos, M., Costa, R., Silva, F., Pascoal, A., Estevinho, L. M., & Choupina, A. B. (2014). Transglutaminases: recent achievements and new sources. *Applied Microbiology and Biotechnology, 98*(16), 6957–6964. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5894-1

Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., & Rito-Palomares, M. (2020). Laccases in food industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8*, 222. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222

Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, *26*(2), 177–185. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001

Meyer, V. (2021). Metabolic Engineering of Filamentous Fungi. *In Metabolic Engineering* (pp. 765–801). https://doi.org/10.1002/9783527823468.ch20

Meyer, V., Fiedler, M., Nitsche, B., & King, R. (2015). The Cell Factory Aspergillus Enters the Big Data Era: Opportunities and Challenges for Optimising Product Formation. In R. Krull & T. Bley (Eds.), *Filaments in bioprocesses* (pp. 91–132). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2014_297

Motta, J., Freitas, B. C., Almeida, A., Martins, G., & Borges, S. (2023). Use of enzymes in the food industry: A review. *Food Science and Technology, 43*. https://doi.org/10.1590/fst.106222

Peña, D. A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M. G., & Mattanovich, D. (2018). Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering, 50,* 2–15. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017

Petcharat, T., & Benjakul, S. (2018). Effect of gellan incorporation on gel properties of bigeye snapper surimi. *Food Hydrocolloids, 77*, 746–753. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.016

Püllmann, P., & Weissenborn, M. J. (2021). Improving the Heterologous Production of Fungal Peroxygenases through an Episomal Pichia pastoris Promoter and Signal Peptide Shuffling System. *ACS Synthetic Biology, 10*(6), 1360–1372. https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00641

Rathnakumar, K., Ortega-Anaya, J., Jimenez-Flores, R., & Martínez-Monteagudo, S. I. (2023). Partition of milk phospholipids during ice cream manufacturing. *Journal of Dairy Science, 106*(11), 7501–7514. https://doi.org/10.3168/jds.2022-23145

Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology, 56*(1), 16–30. https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry, 59*, 1–41. https://doi.org/10.1042/bse0590001

Roy-Chaudhuris B., & Shankar M. (2020). Strains and methods for production of heme-containing proteins (WO2020219972A1).

Saad, M. M., Saad, A. M., Hassan, H. M., Ibrahim, E. I., Abdelraof, M., & Ali, B. A. (2023). Optimization of tannase production by Aspergillus glaucus in solid-state fermentation of black tea waste. *Bioresources and Bioprocessing*, *10*(1), 73. https://doi.org/10.1186/s40643-023-00686-9

Salazar-Cerezo, S., de Vries, R. P., & Garrigues, S. (2023). Strategies for the development of industrial fungal producing strains. *Journal of Fungi*, *9*(8). https://doi.org/10.3390/jof9080834

Siddiqui, S. A., Erol, Z., Rugji, J., Taşçı, F., Kahraman, H. A., Toppi, V., Musa, L., Di Giacinto, G., Bahmid, N. A., Mehdizadeh, M., & Castro-Muñoz, R. (2023). An overview of fermentation in the food industry — Looking back from a new perspective. *Bioresources and Bioprocessing, 10*(1), 85. https://doi.org/10.1186/s40643-023-00702-y

Singh, R., Kim, S., Kumari, A., & Mehta, P. (2022). An Overview of Microbial α-amylase and Recent Biotechnological Developments. *Current Biotechnology, 11*. https://doi.org/10.2174/2211550111666220328141044

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 *Biotech*, *6*(2), 174. https://doi.org/10.1007/s13205–016-0485–8

Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. 3 *Biotech*, *11*(10), 428. https://doi.org/10.1007/s13205–021-02928-z

Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., & Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with Pichia pastoris. *Journal of Biotechnology*, *202*, 118–134. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.027

Sun, H., Bankefa, O. E., Ijeoma, I. O., Miao, L., Zhu, T., & Li, Y. (2017). Systematic assessment of Pichia pastoris system for optimized β -galactosidase production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *2*(2), 113–120. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.04.001

Tekaia, F., & Yeramian, E. (2006). Evolution of proteomes: fundamental signatures and global trends in amino acid compositions. *BMC Genomics*, *7*(1), 307. https://doi.org/10.1186/1471–2164-7–307

Teng, T. S., Chin, Y. L., Chai, K. F., & Chen, W. N. (2021). Fermentation for future food systems: Precision fermentation can complement the scope and applications of traditional fermentation. *EMBO Reports*, *22*(5), e52680. https://doi.org/10.15252/embr.202152680

Vojnovic, S., Aleksic, I., Ilic-Tomic, T., Stevanovic, M., & Nikodinovic-Runic, J. (2024). Bacillus and Streptomyces spp. as hosts for production of industrially relevant enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology, 108*(1), 185. https://doi.org/10.1007/s00253–023-12900-x

White, J. S. (2008). Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 88(6), 1716S-1721S. https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.25825B

Wolff A., Gaydar V., & Cohavi O. (2022). Methods of producing animal-free casein compositions, casein compositions and use of same (Baio Patent). https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.0/publication-dates/20221207/patents/EP4098128NWA1

Yang, H., Song, C., Liu, C., & Wang, P. (2024). Synthetic Biology Tools for Engineering Aspergillus oryzae. *Journal of Fungi*, *10*(1). https://doi.org/10.3390/jof10010034

Yuan, F., Li, G., Li, Z., Li, M., Liu, X., Yang, H., & Yu, X. (2024). Efficient biosynthesis of transglutaminase in Streptomyces mobaraensis via systematic engineering strategies. *Current Research in Food Science*, *8*, 100756. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100756

Yu, F., Zhao, X., Zhou, J., Lu, W., Li, J., Chen, J., & Du, G. (2023). Biosynthesis of High-Active Hemoproteins by the Efficient Heme-Supply Pichia Pastoris Chassis. *Advanced Science*, *10*(30), e2302826. https://doi.org/10.1002/advs.202302826

Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y., & Wang, Y. (2004). Purification and characterization of inulinase from Aspergillus niger AF10 expressed in Pichia pastoris. *Protein Expression and Purification*, *35*(2), 272–275. https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.02.015

Zhang, X., Chen, S., Lin, Y., Li, W., Wang, D., Ruan, S., Yang, Y., & Liang, S. (2023). Metabolic Engineering of Pichia pastoris for High-Level Production of Lycopene. *ACS Synthetic Biology*, *12*(10), 2961–2972. https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00294

Zhu, M., Zhai, W., Song, R., Lin, L., Wei, W., & Wei, D. (2023). Enhanced thermostability of *Geobacillus stearothermophilus α-Amylase* by rational design of disulfide bond and application in corn starch liquefaction and bread quality improvement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71*(48), 18928–18942. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06761