

Volume 6, Issue 4, 2023

ПИЩЕВЫЕ СИСТЕМЫ
ПИЩЕВЫЕ СИСТЕМЫ

ПИЩЕВЫЕ СИСТЕМЫ
FOOD SYSTEMS

FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS
FOOD SYSTEMS

ISSN 2618-9771 (Print)

ISSN 2618-7272 (On line)

<http://www.fsjour.com>

Национальный, рецензируемый журнал посвящен основным проблемам науки о пищевой промышленности. Основной миссией является: создание, агрегация, поддержка и распространение научного контента в области пищевой промышленности, объединение усилий исследователей научных центров, университетов, преодоление разрыва между изданиями регионального, национального и федерального уровней. Журнал призван освещать актуальные проблемы в пищевой и смежных отраслях, продвигать новые перспективные технологии в широкую аудиторию научных и практических работников, преподавателей, аспирантов, студентов, предпринимателей. Научная концепция издания предполагает публикацию новых знаний в области пищевых систем и научных основ ресурсосберегающих технологий глубокой переработки сельскохозяйственного сырья, прорывных технических решений для производства пищевых продуктов общего и специализированного назначения. В журнале публикуются научные и обзорные статьи, доклады, сообщения, рецензии, краткие научные сообщения (письма в редакцию), информационные публикации по направлениям: технология пищевых производств; процессы, оборудование и аппараты пищевых производств; гигиена питания; биотехнология; стандартизация, сертификация, качество и безопасность; экономика; автоматизация и информатизация технологических процессов. Подробная информация для авторов и читателей представлена на сайте: www.fsjour.com.

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

ПИЩЕВЫЕ СИСТЕМЫ
www.fsjour.com

Учредитель, издатель и типография
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный научный
центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316, Москва, Талалихина, 26

РЕДАКЦИЯ

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316, Москва, Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-95-11, доб. 300
e-mail: a.zakharov@fncps.ru

Журнал зарегистрирован в Роскомнадзоре

Регистрационные данные:

ПИ № ФС77-71610 от 13.11.2017

ЭЛ № ФС 77-72022 от 26.12.2017

Издается с 2018 года.

Материалы публикуются на условиях лицензии CC BY 4.0

Цена свободная.

Периодичность — 4 номера в год.

Подписано в печать 27.12.2023.

Дата выхода в свет 29.12.2023.

Тираж 300 экз. Заказ № 515.

© ФНЦПС, 2023

© Авторы, 2023

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Кузнецова Оксана Александровна — Доктор технических наук, Директор, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Лисицын Андрей Борисович — Доктор технических наук, профессор, Академик РАН, Лауреат Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники, Научный руководитель, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Семенова Анастасия Артуровна — Доктор технических наук, профессор, Заместитель директора, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ:

Горлов Иван Федорович — Доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН, Научный руководитель, Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции, Волгоград, Россия

Замаратская Галия — Кандидат технических наук, доцент, Научный работник, Шведский университет аграрных наук, г. Упсала, Швеция

Настасиевич Иван — Доктор, Адъюнкт-директор, Институт гигиены и технологии мяса, Белград, Сербия

Такеда Широ — Адъюнкт-профессор, Профессор лаборатории науки о пище, Институт ветеринарной медицины, Университет Азабу, Сагамихара, Япония

Просеков Александр Юрьевич — Доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Ректор, Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Горбунова Наталия Анатольевна — Кандидат технических наук, Ученый секретарь, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Arif Nur Muhammad Ansori — PhD, Доктор ветеринарных наук, научный сотрудник, Университет Айрланга, Сурабая, Индонезия

ВЫПУСКАЮЩИЙ РЕДАКТОР:

Захаров Александр Николаевич — Кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Заведующий редакционно-издательским отделом, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, РАН, Москва, Россия

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Абрамова Любовь Сергеевна — Доктор технических наук, профессор, Заместитель директора Департамента, Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

Баженова Баяна Анатольевна — Доктор технических наук, профессор, Профессор кафедры «Технология мясных и консервированных продуктов», Восточно-Сибирский университет технологии и управления, Улан-Удэ, Россия

Галстян Арам Генрихович — Доктор, технических наук, академик РАН, Директор, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности РАН, Москва, Россия

Донник Ирина Михайловна — Доктор биологических наук, профессор, Академик РАН, Вице-президент РАН, Москва, Россия

Евдокимов Иван Алексеевич — доктор технических наук, профессор, Заведующий кафедрой «Технология молока и молочных продуктов» Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Иванкин Андрей Николаевич — Доктор химических наук, профессор, Заведующий кафедрой «Химия», Мытищинский филиал МГТУ им. Н. Э. Баумана, Мытищи, Московская область, Россия

Кочеткова Алла Алексеевна — Доктор технических наук, профессор, Руководитель лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

Машенцева Наталья Геннадиевна — Доктор технических наук, доцент, профессор РАН, профессор, кафедра «Биотехнология и технология продуктов биорегулируемого синтеза» Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Мирошников Сергей Александрович — Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Ректор, Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

Римарева Любовь Вячеславовна — Доктор технических наук, профессор, Академик РАН, Главный научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

Петров Андрей Николаевич — Доктор технических наук, профессор, Академик РАН, Директор, Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Видное, Московская область, Россия

Ребезов Максим Борисович — Доктор сельскохозяйственных наук, профессор, Главный научный сотрудник, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Чернуха Ирина Михайловна — Доктор технических наук, профессор, Академик РАН, Заведующий отделом, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия

16+

ISSN 2618-9771 (Print)

ISSN 2618-7272 (Online)

DOI-prefix: 10.21323/2618-9771

The national peer reviewed journal is dedicated to the main problems of food science. The main mission is to create, aggregate, support and distribute the scientific content in the field of the food industry, join the efforts of researchers from scientific centers and universities, bridge the gap between publications at the regional, national and federal levels. The journal serves to highlight topical problems in the food and related industries, promote new promising technologies among the wide audience of scientific and practical professionals, lecturers, students, postgraduate students and entrepreneurs. The scientific concept of the journal envisages publication of new knowledge in the field of food systems and scientific foundations of the resource saving technologies for deep processing of agricultural raw materials, breakthrough technical solutions for producing food of general and specialized purpose. The journal publishes scientific and review papers, reports, communications, critical reviews, short scientific communications (letters to the editorial office), information materials concerned with food technology, processes, equipment and apparatus for food production, nutritional hygiene, biotechnology, standardization, certification, quality and safety, economics, automation and informatization of technological processes. The detailed information is given on the site: www.fsjour.com.

**Minister of Science and Higher Education
of the Russian Federation**

**V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food
Systems of Russian Academy of Sciences
(Gorbatov Research Center for Food Systems)**

FOOD SYSTEMS
www.fsjour.com

**Founder, Publisher and Printing Office:
Federal State Budgetary Scientific Institution
“V.M. Gorbatov Federal Research Center
for Food Systems of Russian Academy of Sciences”
Talalikhina str. 26, Moscow, Russia, 109316**

EDITORIAL OFFICE:

Federal State Budgetary Scientific Institution
“V.M. Gorbatov Federal Research Center
for Food Systems of Russian Academy of Sciences”
Talalikhina str. 26, Moscow, Russia, 109316
Tel.: +7-495-676-95-11 extension 300
e-mail: a.zakharov@fncps.ru

The Journal is registered in the Federal Service on Supervision
in the sphere of communication industry, information
technologies and public communications.

The certificate of registration is
PI № FS 77 – 71610 of 13.11.2017
EL № FS 77 – 72022 of 26.12.2017

Founded in 2018.

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution 4.0 License
Free price.

Frequency — 4 issues a year.

Signed print 27.12.2023.

Released from press 29.12.2023.

Circulation — 300 copies. Order № 515.

EDITORIAL BOARD

EDITOR-IN-CHIEF:

Oxana A. Kuznetsova, Doctor of technical sciences, Director, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF:

Andrey B. Lisitsyn, Doctor of technical sciences, Professor, Academician of RAS, Scientific supervisor, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF:

Anastasiya A. Semenova, Doctor of technical sciences, Professor, Deputy Director, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

SCIENTIFIC EDITORS:

Ivan F. Gorlov, Doctor of agricultural sciences, Professor, Academician of RAS, Scientific supervisor of Povolzhskiy Research Institute of Production and Processing of Meat and Dairy Products, Volgograd, Russia

Galia Zamaratskaya, Candidate of technical sciences, Docent, Research Worker, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

Ivan Nastasijevic, Doctor, Associate Director, Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrad, Serbia

Takeda Shiro, Associate Professor, Laboratory of Food Science School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagami-hara, Japan

Aleksandr Yu. Prosekov, Doctor of technical sciences, Professor, Corresponding member of RAS, Rector, Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

Natalia A. Gorbunova, Candidate of technical sciences, Academic Secretary, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Arif Nur Muhammad Ansori, Doctor, Doctor in Veterinary Sciences, Researcher, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

PRODUCTION EDITOR:

Aleksandr N. Zakharov, Candidate of technical sciences, Senior research worker, Head of the Department of Editorial and Publishing, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

MEMBERS OF THE EDITORIAL BOARD:

Liubov S. Abramova, Doctor of technical sciences, Professor, Deputy Director of the Department, Russian Federation Research Institute of Fishery and Oceanography, Moscow, Russia

Baiana A. Bazhenova, Doctor of technical sciences, Professor, Professor of the chair «Meat and canned product technology» of East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia

Aram G. Galstyan, Doctor of technical sciences, Academician of RAS, Director, All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia

Irina M. Donnik, Doctor of biological sciences, Professor, Academician of RAS, Vice president of RAS, Moscow, Russia

Ivan A. Evdokimov, Doctor of technical sciences, Professor, Head of the chair “Technology of milk and dairy products”, North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

Andrey N. Ivankin, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the chair of Chemistry, Mytishchi branch of Bauman Moscow State Technical University, Mytishchi, Moscow region, Russia

Alla A. Kochetkova, Doctor of technical sciences, Professor, Head of the «Laboratory of food biotechnologies and specialized products», Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety, Moscow, Russia

Natal'ya G. Mashentseva, Doctor of technical sciences, Professor RAS, Professor, Chair of Biotechnology and Technology of Products of Bioorganic Synthesis, Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia

Sergey A. Miroshnikov, Doctor of biological sciences, Professor, Corresponding member of RAS, Rector, Orenburg State University, Orenburg, Russia

Liubov V. Rimareva, Doctor of technical sciences, Professor, Academician of RAS, Chief Researcher, All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology — branch Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety, Moscow, Russia

Andrey N. Petrov, Doctor of technical sciences, Professor, Academician of RAS, Director, All-Russian Research Institute of Canning Technology — Branch of V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS, Vidnoe, Moscow region, Russia

Maxim B. Rebezov, Doctor of agricultural sciences, Professor, Chief Researcher, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Irina M. Chernukha, Doctor of technical sciences, Professor, Academician of RAS, Head of the Department, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia



© FNCPS, 2023
© Authors, 2023

ISSN 2618-9771 (Print)
ISSN 2618-7272 (Online)
DOI-prefix: 10.21323/2618-9771

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ

Зинина О. В., Николина А. Д., Хвостов Д. В., Ребезов М. Б., Завьялов С. Н., Ахмедзянов Р. В. БЕЛКОВЫЙ ГИДРОЛИЗАТ КАК ИСТОЧНИК БИОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ДИАБЕТИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ	440
Волончук С. К., Мазалевский В. Б., Станкевич С. В., Чекрыга Г. П. ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА КОРМОВУЮ СМЕСЬ ПОДСОЛНЕЧНОГО ЖМЫХА И МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ	449
Витол И. С., Мелешкина Е. П., Крикунова Л. Н. КОМПОЗИЦИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ПОЛИКОМПОНЕНТНЫХ ОТРУБЕЙ	457
Юшина Ю. К., Семенова А. А., Кузнецова О. А., Сатабаева Д. М., Зайко Е. В., Велебит Б. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ВИРУСОВ ИЗ ПИЩЕВЫХ МАТРИЦ И ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ КОНТАМИНИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ В ТОРГОВОЙ СЕТИ	463
Viol D. Kharisma, Arif N. M. Ansori, Vikash Jakhmola, Emdad Ullah, Hery Purnobasuki BIOINFORMATICS STUDY OF THE SELECTIVE INHIBITOR FROM <i>GARCINIA MANGOSTANA</i> L. TACKLE HIV-1 INFECTION	471
Dmitriy S. Myagkonosov, Dmitriy V. Abramov, Irina N. Delitskaya, Galina B. Bukcharina INFLUENCE OF DIFFERENT MILK-CLOTTING ENZYMES ON THE QUALITY AND SHELF LIFE OF SEMIHARD CHEESES	477
Цырендоржиева С. В., Жамсаранова С. Д., Баженова Б. А., Хамаганова И. В. БАДАН ТОЛСТОЛИСТНЫЙ КАК АЛЬТЕРНАТИВА СИНТЕТИЧЕСКИМ КРАСИТЕЛЯМ ДЛЯ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ	488
Сутула Г. И., Рябухин Д. С. МИКРОВОДОРОСЛИ И НАСЕКОМЫЕ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ БЕЛКА: ПРЕИМУЩЕСТВА И РИСКИ	497
Yuliya A. Dovganeva, Yuliya V. Katrashova, Tatyana V. Kirillova THE ECOSYSTEM OF VERTICAL FARMS: A CONCEPTUAL FRAMEWORK	504
Свириденко Г. М., Шухалова О. М., Данилова Е. С. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ И МЕТАБОЛИЗМА ШТАММОВ <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО ЖИДКОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	512
Dongjie Luo, Marina A. Nikitina, Xinqing Xiao FLEXIBLE SENSORS FOR FOOD MONITORING. PART I: PRINCIPLE	519
Ситникова П. Б., Казакова Н. В. ОБОСНОВАНИЕ, НАПРАВЛЕНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В ПРОИЗВОДСТВЕ МОРОЖЕНОГО	531
Полищук Е. К., Арюзина М. А., Спирина М. Е., Котенкова Е. А. ВЛИЯНИЕ PH НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ <i>SUS SCROFA</i>	539
Igor T. Smykov THE KINETICS OF MILK GEL STRUCTURE FORMATION STUDIES BY ELECTRON MICROSCOPY	547
Юраскина Т. В., Соколова Е. Н., Фурсова Н. А., Серба Е. М. ИННОВАЦИОННЫЙ ПОДХОД К ОБОГАЩЕНИЮ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ	554

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-440-448>

Поступила 12.05.2023

Поступила после рецензирования 27.10.2023

Принята в печать 01.11.2023

© Зинина О. В., Николина А. Д., Хвостов Д. В., Ребезов М. Б., Завьялов С. Н., Ахмедзянов Р. В., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

БЕЛКОВЫЙ ГИДРОЛИЗАТ КАК ИСТОЧНИК БИОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ДИАБЕТИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ

Зинина О. В.^{1,*}, Николина А. Д.¹, Хвостов Д. В.², Ребезов М. Б.², Завьялов С. Н.³, Ахмедзянов Р. В.³

¹ Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия

² Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Москва, Россия

³ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

молочная сыворотка, лабораторные животные, дипептидилпептидаза-4, диабет, белковый гидролизат, напиток

Белковые гидролизаты являются перспективным активным компонентом в специализированных продуктах питания. Благодаря наличию в их составе биоактивных пептидов с ингибирующей ферменты активностью, белковые гидролизаты проявляют различные физиологические эффекты. Целью исследований является установление потенциальной гипогликемической активности белкового гидролизата желудков цыплят-бройлеров в молочной сыворотке, а также разработка на его основе напитка для больных сахарным диабетом. Методом УВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией была проведена оценка белковых гидролизатов, полученных из микробной ферментации мышечных желудков цыплят-бройлеров в молочной сыворотке. При помощи базы данных BioPer определялось молекулярно-массовое распределение пептидов в гидролизатах, а также были выявлены биоактивные пептиды, проявляющие ингибирующую активность в отношении ферментов дипептидилпептидазы-4 и амилазы. На основе полученных гидролизатов в программе Excel были смоделированы рецептуры напитков для пациентов с сахарным диабетом с учетом рекомендаций по питанию для данной группы населения. По полученным рецептурам в лабораторных условиях были изготовлены напитки и оценен их вкус. Исследовано влияние напитка на снижение глюкозы в крови у лабораторных животных при однократном введении дозировки 1,3 мл перорально перед основным приемом пищи. Результаты исследований пептидного состава белковых гидролизатов показали наличие в них биоактивных пептидов с подтвержденной по базе BioPer ингибирующей ферменты дипептидилпептидазы-4 и альфа-глюкозидазу активностью — SY, VW, SW. В белковом гидролизате, полученном ферментацией сырья пропионовокислыми бактериями, суммарно оказалось наибольшее количество указанных биоактивных пептидов — 37,1 мг/100 г гидролизата. Напиток, изготовленный на основе белкового гидролизата и лимонного сока, оказался по вкусу более приемлемым для потребителей, чем напиток со вкусом какао. Результаты испытаний *in vivo* показали, что напиток на основе белкового гидролизата эффективен для снижения сахара в крови как здоровых, так и больных сахарным диабетом крыс. Уровень сахара в крови у здоровых животных в группе Г1 (без использования напитка) повышался на 151% относительно начальных значений, что является более высоким показателем по сравнению с группой Г2 (с использованием напитка), где повышение составило 87%. У больных животных в группе Г3 (без использования напитка) также наблюдался более значительный рост уровня сахара в крови — 61% относительно начальных значений, в то время как в группе Г4 (с использованием напитка) это повышение составило 46%. Таким образом, результаты исследований показали перспективность применения белковых гидролизатов из желудков цыплят-бройлеров в сыворотке в качестве активного гипергликемического компонента в напитках для людей, больных сахарным диабетом, однако необходимо проведение более глубоких исследований, в том числе на репрезентативной группе пациентов.

Received 12.05.2023

Accepted in revised 27.10.2023

Accepted for publication 01.11.2023

© Zinina O. V., Nikolina A. D., Khvostov D. V., Rebezov M. B., Zavyalov S. N., Akhmedzyanov R. V., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

PROTEIN HYDROLYSATE AS A SOURCE OF BIOACTIVE PEPTIDES IN DIABETIC FOOD PRODUCTS

Oksana V. Zinina^{1,*}, Anna D. Nikolina¹, Daniil V. Khvostov², Maksim B. Rebezov², Sergey N. Zavyalov³, Roman V. Akhmedzyanov³

¹ South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

² V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

³ South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

KEY WORDS:

whey, laboratory animals, dipeptidyl peptidase-4, diabetes, protein hydrolysate, beverage

ABSTRACT

Protein hydrolysates are a promising active component in specialized food products. Due to the presence of bioactive peptides with enzyme inhibiting activity in their composition, protein hydrolysates exert different physiological effects. The aim of the research was to establish the potential hypoglycemic activity of the protein hydrolysate of broiler chicken stomachs in whey and to develop a beverage on its basis for patients with diabetes mellitus. Protein hydrolysates obtained from microbial fermentation of muscular stomachs of broiler chickens in whey were assessed by UHPLC coupled to mass-spectrometry. Using the BioPer database, the molecular weight distribution of peptides in the hydrolysates was determined. In addition, bioactive peptides showing the inhibitory activity toward enzymes dipeptidyl peptidase-4 and amylase were revealed. Based on the obtained hydrolysates, recipes of beverages for patients with diabetes mellitus were modeled in the Excel software program with regard to the recommendations for nutrition of this population group. According to the obtained recipes, beverages were produced in the laboratory conditions and their taste was assessed. An effect of the beverage on glucose reduction in the blood of laboratory animals was assessed upon single peroral administration with a dose of 1.3 ml before the main meal. The results of the investigation of the peptide composition of protein hydrolysates showed the presence of bioactive peptides (SY, VW, SW)

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Зинина, О. В., Николина, А. Д., Хвостов, Д. В., Ребезов, М. Б., Завьялов, С. Н., Ахмедзянов Р. В. (2023). Исследование свойств белковых гидролизатов как потенциальной основы биоактивных пленочных покрытий. *Пищевые системы*, 6(4), 440-448. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-440-448>

FOR CITATION: Zinina, O. V., Nikolina, A. D., Khvostov, D. V., Rebezov, M. B., Zavyalov, S. N., Akhmedzyanov, R. V. (2023). Protein hydrolysate as a source of bioactive peptides in diabetic food products. *Food Systems*, 6(4), 440-448. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-440-448>

in them with the inhibitory activity toward enzymes dipeptidyl peptidase-4 and amylase confirmed by the BioPep database. The highest amount of the above indicated bioactive peptides (37.1 mg/100 g hydrolysate) was in the protein hydrolysate produced by fermentation of raw materials with propionic acid bacteria. The beverage produced on the basis of the protein hydrolysate and lemon juice was more acceptable for consumers in terms of taste than the beverage with the taste of cacao. The results of the *in vivo* trials showed that the beverage based on the protein hydrolysate was effective in reducing sugar in blood of both healthy rats and rats with diabetes mellitus. The blood sugar level in the healthy animals of the G1 group (without using the beverage) increased by 151% relative to the initial values, which was a higher value compared to the G2 group (with the use of the beverage), where an increase was 87%. A more significant growth in the blood sugar level (61% relative to the initial values) was also observed in the ill animals in the G3 group (without using the beverage), while this increase was 46% in the G4 group (with the use of the beverage). Thus, the results of the study show the prospects of using the protein hydrolysates from broiler chicken stomachs in whey as an active hypoglycemic component in beverages for patients with diabetes mellitus. However, more profound research is necessary including studies on the representative group of patients.

1. Введение

Проблема широкого распространения диабета и поиск новых методов и средств для лечения и контроля этого заболевания актуальны во всем мире [1,2].

Целью проводимых исследований является возможность разработки натуральных ингредиентов с выраженным терапевтическим эффектом и с минимальным побочным действием, а также перспектива создания продуктов питания нового поколения с данными ингредиентами [3–5].

Биоактивные пептиды и гидролизаты белков, получаемые в результате ферментации пищевого сырья, в последние годы являются объектом внимания многих ученых из-за широкого спектра биологических свойств: ингибирование ангиотензин-1-превращающего фермента (АПФ), антиоксидантное, антипролиферативное, противовоспалительное, цитомодулирующее, противомикробное, иммуномодулирующее свойства [6,7].

Белковые гидролизаты (БГ) содержат биоактивные пептиды — небольшие фрагменты белка, имеющие 2–20 аминокислотных остатков и молекулярные массы менее 6000 Da. От количества и последовательности аминокислот в пептидах зависит их биологическая активность. При этом различные факторы оказывают влияние на высвобождение определенных пептидов при гидролизе белка: состав исходного сырья и биологического агента, участвующего в расщеплении полипептидной цепи, пептидный и аминокислотный составы получаемых БГ, степень гидролиза сырья [8].

Биологически активные пептиды при высвобождении протеолитическими ферментами могут регулировать физиологические функции организма, проявляя антиоксидантные, антибактериальные, противогрибковые, и другие физиологические свойства [9].

Биоактивные гидролизаты получают при направленном ферментативном гидролизе белковых молекул. В качестве биологических агентов используют как отдельные виды протеолитических ферментов, так и микроорганизмы с высокой протеолитической активностью. Примером таких бактерий являются бифидобактерии и пропионовокислые бактерии, которые имеют способность к синтезу биологически активных веществ, ферментов, органических кислот, благодаря чему белковый субстрат преобразуется до низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот.

Белковые гидролизаты и биологически активные пептиды, выделенные из пищевых белков, благодаря своим биологическим свойствам широко применяются как биоактивный компонент в продуктах специализированного и функционального питания [10–12].

Сахарный диабет относится к группе метаболических заболеваний, характеризующихся гипергликемией вследствие нарушений секреции/действия инсулина.

Существует два преобладающих типа диабета: диабет 1-го типа (СД1, 10% пациентов) и диабет 2-го типа (СД2, 90% пациентов) [13].

Как основная форма диабета СД2 характеризуется гиперинсулинемией и резистентностью к инсулину, что связано с глубокими изменениями метаболизма глюкозы и липидов в организме. Развитию СД2 способствуют генетические параметры и факторы окружающей среды. В одних и тех же генетических условиях нездоровое питание, неправильный выбор продуктов питания и недостаток физической активности могут привести к возникновению данного заболевания. Пища и питание играют ключевую роль в лечении диабетических симптомов при СД2. Пациенту с сахарным диабетом необходимо легкоусвояемое, богатое витаминами питание, которое влечет за собой снижение уровня глюкозы в крови. Медицинские специалисты рекомендуют диеты с умеренно сниженной энергоценностью с целью сокращения потребления легкоусвояемых углеводов и животных жиров, с преобладанием в рационе продуктов растительного происхождения [14,15].

Одним из рекомендуемых компонентов питания для пациентов с сахарным диабетом являются белковые гидролизаты — источники биоактивных пептидов с ингибирующей ферменты активностью: дипептидилпептидазу-4, α -глюкозидазу и α -амилазу. Амилаза и глюкозидаза являются важнейшими ферментами в расщеплении углеводов. Сахар поступает в организм человека в основном с продуктами питания, а главным компонентом углеводов в рационе является крахмал. Однако молекулярные сегменты крахмала и дисахарида велики и не способны напрямую всасываться в кровоток человека — они должны проходить через воздействие амилазы и ворсинок тонкого кишечника. Альфа-глюкозидаза производит моносахариды (глюкозу и фруктозу) синергетическим образом до их абсорбции. Следовательно, количество глюкозы можно уменьшить, контролируя две ферментативные реакции α -амилазы и α -глюкозидазы [16]. Дипептидилпептидаза-4 присутствует на мембранах всех клеток в организме, и она связана с гормонами, способствующими выделению инсулина — глюкозозависимым инсулинотропным полипептидом и глюкагоноподобным пептидом-1. Дипептидилпептидаза-4 регулирует выделение этих гормонов и при сахарном диабете выделяется в излишнем количестве, что снижает секрецию инсулина. Следовательно, ингибирование этих ферментов может иметь решающее значение для уменьшения количества глюкозы, выделяющейся в организме, и оказывать влияние на желудочно-кишечный тракт [17]. Ингибирование гидролизующих углеводов ферментов рекомендовано в качестве практического подхода к регулированию уровня сахара в крови [18]. Окислительный стресс как результат гипергликемии может вызывать повреждение печени при диабете, и гидролизаты белков с антидиабетическими и антиоксидантными свойствами используются в качестве потенциальной терапии [19]. Отмечено, что биоактивные пептиды в настоящее время являются одним из наиболее широко изученных потенциальных терапевтических средств при лечении СД2 [20].

В качестве составляющих рецептуры напитка были выбраны следующие компоненты: белковый гидролизат как источник биоактивных пептидов, сироп лактулозы как эффективный пребиотик и вкусовой компонент, а также лимонный сок и какао в качестве вкусовых компонентов и источников витаминов.

Гиповитаминоз С часто встречается при диабете. Причиной этого являются диетические факторы, окислительный стресс и воспалительные процессы [21].

Поэтому в диетическом питании обосновано увеличение доз витамина С либо путем корректировки рациона, либо при помощи добавок.

Обширный обзор научной литературы выявил данные, подтверждающие способность лактулозы стимулировать рост бифидобактерий и улучшать состояние микробиоты кишечника, проявлять антиоксидантный и антиканцерогенный эффекты, положительно влиять на усвоение минеральных веществ. Обозначена возможность применения лактулозы в диабетическом питании для снижения содержания глюкозы в крови [22].

Таким образом, специализированное питание — неотъемлемая часть лечения и возможность поддержания физиологического состояния организма как при СД2, так и при СД1. В связи с этим актуальным является разработка и внедрение в промышленное производство специализированных продуктов заданного состава с исключением из рецептуры сахара, содержащих не только дефицитные при данном заболевании витамины и минеральные вещества, но и биоактивные вещества [23].

Целью исследований является установление потенциальной гипогликемической активности белкового гидролизата желудков цыплят-бройлеров в молочной сыворотке и разработка на его основе напитка для пациентов с сахарным диабетом.

2. Объекты и методы

Объектом исследований являются:

- белковые гидролизаты (БГ), полученные микробной ферментацией желудков цыплат-бройлеров в молочной сыворотке;
- напитки на основе белкового гидролизата.

Технологическая схема получения БГ представлена на Рисунке 1, оптимальные параметры процесса гидролиза (температура, продолжительность, количество закваски) были установлены при проведении многофакторного эксперимента в ранее опубликованной научной статье [24].

Для ферментации сырья и получения белковых гидролизатов использовали закваски пробиотических бактерий с высокой протеолитической активностью: жидкий концентрат бифидобактерий (опытный образец БГ, ферментированный BLC) и концентрат пропионовокислых бактерий «Пропионикс» (опытный образец БГ, ферментированный Proportion LCSC) («Пропионикс», Москва, Россия). При получении контрольного образца БГ при сыровотку ферментировали без введения бактериальных концентратов.

Количество вводимых бактериальных препаратов составляло $1 \cdot 10^8$ КОЕ/см³.

У полученных белковых гидролизатов исследовали молекулярно-массовое распределение пептидов методом УВЭЖХ, совмещенной с масс-спектрометрией, с последующей идентификацией полученных пептидов и с установлением их биологической активности методом *in silico*. Хроматографическое разделение исследуемых пептидов проводили с использованием системы УВЭЖХ 1290 Infinity (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), аналитической колонки AdvanceBio Peptide Mapping 120Å (2,1 × 250 мм, размер частиц 2,7 мкм (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США)) и аналитической защитной колонки ZORBAX Extend-C18 (4,6 × 12,5 мм, 5 мкм) (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Подвижную фазу — H₂O (А) и ACN (В), приготовленные с 0,1% муравьиной кислотой (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Германия) v/v, — прокачивали со скоростью 0,2 мл/мин, объем впрыска составлял 10 мкл.

Хроматографию проводили в линейном градиенте следующим образом: 2% растворитель В — 5 мин, от 2% до 43% растворитель В — 165 мин, от 43% до 100% растворитель В — 1 мин, 100% растворитель В — 6 мин. После этого градиент вернулся к начальному значению 98% А через 7 мин. Общее время анализа составило 184 мин.

Времяпролетный масс-спектрометрический детектор Agilent 6545XT AdvanceBio LC/QTOF (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), оснащенный DuoJet Stream ESI (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) и ионной воронкой, установленный в режиме положительной ионизации, соединены с системой УВЭЖХ.

Были заданы следующие основные рабочие параметры квадрупольно-времяпролетной МС:

- капиллярное напряжение 4000 В; напряжение сопла 500 В;
- поток газа-осушителя 13 л/мин при 325 °С;
- расход газа через кожух 12 л/мин при 275 °С;
- давление распылителя 35 фунтов на квадратный дюйм.

Ионная воронка высокого давления работала при высокой частоте (ВЧ) 150 В, воронка низкого давления — при 65 В ВЧ, а октополь — при 750 В. Анализы проводились в режиме полного сканирования МС и в автоматическом режиме МС/МС с полным сканированием от 150 до 2100 м/з. Спектры фрагментов были получены для каждой массы с использованием энергии столкновения, заданной программным алгоритмом получения ионов MS2 [25].

В экспериментах МС/МС в качестве газа для столкновений применялся азот. Пурин ([M + H]⁺ = 121,0509) и соединение Agilent HP0921 ([M + H]⁺ = 922,0098) задействовались в качестве эталонного раствора для калибровки внутренней массы на протяжении всего анализа.

Обнаруженные соединения (более 300) идентифицировали методом МС-фрагментации с использованием программного обеспечения MSDIAL (версия 5.1, RIKEN CSRS, Yokohama City, Japan) с точным допуском по массе MS1 (0,01 Да) и MS2 (0,05 Да) [26]. Содержание пептидов определяли по стандартной кривой с применением «Лейттрагина®» в диапазоне концентраций 1–1000 нг/мл; коэффициент регрессии > 0,990. Значения для каждого пептида выражали в мг-экв. Лейттрагин/100 г гидролизатов [27].

Каждое измерение проводили трехкратно. Значения вероятности $p \leq 0,05$ были приняты для указания статистической значимости. Данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA по критерию Тьюки [https://houssein-assaad.shinyapps.io/TableReport/].

Идентифицированные пептиды анализировали с использованием баз данных BioPep [28] и PeptideRanker [29].

На основе полученных БГ были смоделированы рецептуры напитков с учетом рекомендаций по диабетическому питанию в программе Excel Solver (Microsoft, США). В качестве компонентов напитков приняты следующие ингредиенты вода — X₁, БГ — X₂, лимонный сок (или какао) — X₃, сироп лактулозы — X₄.

По оптимизированной рецептуре изготовлены напитки по технологии, представленной на Рисунке 2. Методом парного сравнения согласно ГОСТ ISO 6658–2016¹ выбран наиболее приемлемый образец напитка по вкусу неподготовленными испытуемыми (потенциальными потребителями напитка).

Оценку эффективности влияния полученного напитка на снижение уровня глюкозы в крови проводили методом *in vivo* с использованием половозрелых (3 месяца от рождения) белых лабораторных крыс-самцов линии Wistar (ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», Россия). Животные были разделены на 2 экспериментальные группы: контрольная группа, включающая интактных крыс (n=5, m=411,2 ± 21,3 г), опытная группа, включающая животных с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа (n=5, m=418,4 ± 21,1 г).

¹ ГОСТ ISO 6658–2016 «Органолептический анализ. Методология. Общее руководство». М.: Стандартинформ, 2016. — 26 с.

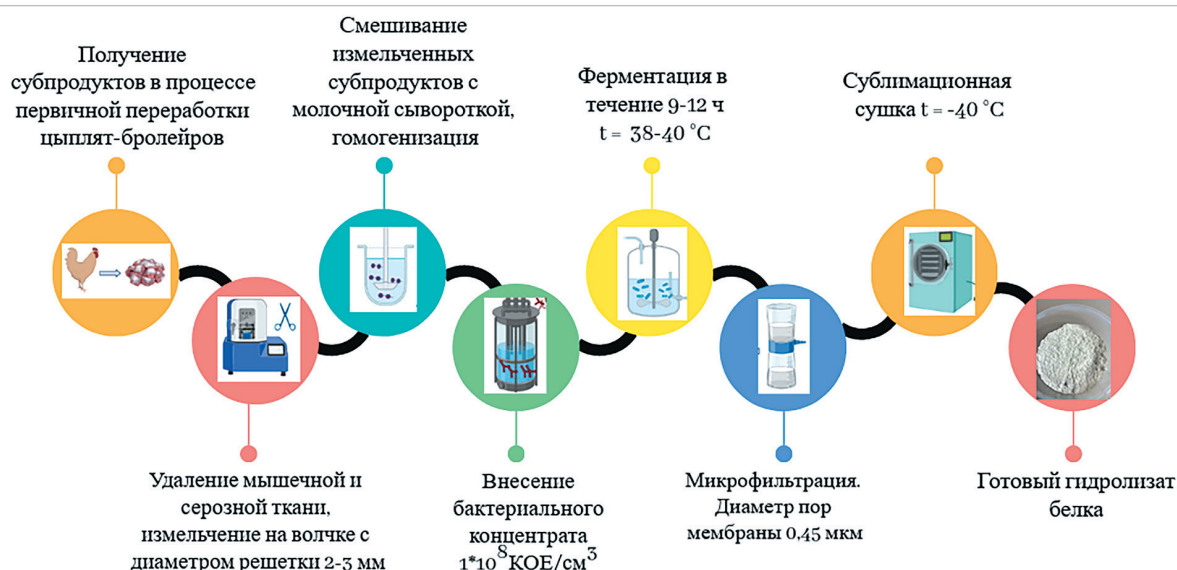
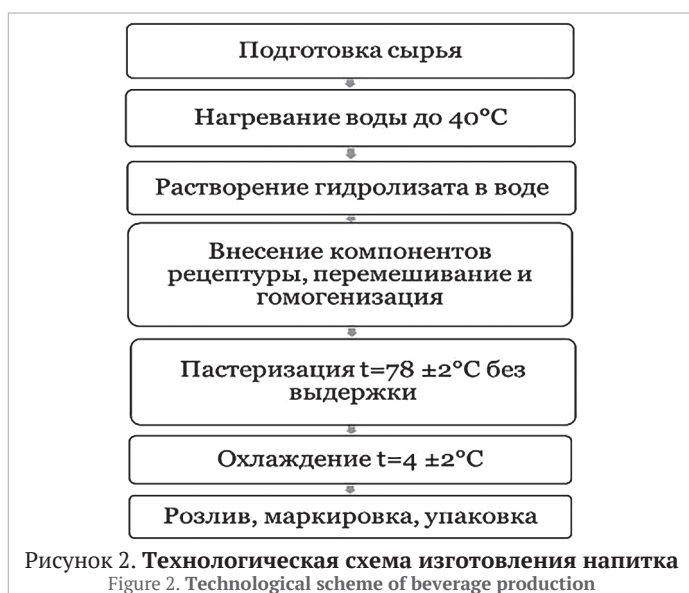


Рисунок 1. Технологическая схема получения белковых гидролизатов (создано с помощью программного обеспечения Visma (Осло, Норвегия))

Figure 1. Technological scheme of protein hydrolysate production (created with the use of the Visma software (Oslo, Norway))



- Группы животных обозначены следующим образом:
- Г1 — контрольная группа животных с углеводной нагрузкой;
 - Г2 — контрольная группа животных с углеводной нагрузкой и напитком;
 - Г3 — опытная группа животных с углеводной нагрузкой;
 - Г4 — опытная группа животных с углеводной нагрузкой и напитком.

Моделирование сахарного диабета производили по общепринятой методике с использованием диabetогенного вещества — аллоксана тригидрата (РЕАХИМ, Москва, Россия) в 0,4 мл раствора цитратного буфера. Вещество вводили внутривенно однократно в дозировке 163 мг/кг [30].

Верификацию модели осуществляли путем измерения уровня глюкозы в крови натощак по истечении недели после инъекции аллоксана. Исследование показало, что уровень измеряемого показателя составил $3,2 \pm 0,31$ ммоль/л у животных контрольной группы и $22,1 \pm 1,6$ ммоль/л у крыс с экспериментальной патологией.

После выведения животных из эксперимента верификация модели проводилась повторно с использованием морфологического исследования серийных срезов поджелудочной железы животных (кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Челябинск, Россия).

Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целях»² и согласно Федеральному закону Российской Федерации от 27.12.2018 № 498-ФЗ³.

Все исследуемые лабораторные животные содержались в стандартных условиях экспериментально-биологической клиники (вивария) ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России в соответствии с требованиями ГОСТ 33216–2014⁴ и пункта 3 РД-АПК 3.10.07.02–09⁵. Животные содержались в индивидуальных клетках размером 460 × 300 × 160 мм со сплошным дном со стандартным подстилочным материалом в виде гранулированных древесных опилок. Клетки размещались в специализированной приточно-вытяжной вентиляционной установке с автоматическим регулированием светового режима (12 часов «дневного режима»). Режим кормления был составлен с учетом особенностей питания и содержания лабораторных животных. Кормление осуществляли полнорационным гранулированным кормом «Дельта Фидс» («БиоПро», Россия).

Для оценки потенциальной гипогликемической активности белкового гидролизата спустя 2 недели после инъекции аллоксана экспериментальным животным проводили глюкозотолерантный тест без использования напитка и с его применением.

Для этого в первой серии экспериментов натощак после суточного голодания опытным животным внутрижелудочно вводили раствор глюкозы («Мосфарм», пгт Богородское, Сергиево-Посадский р-н, Московская область, Россия) в дозировке 2 г/кг живой массы.

Через 7 суток после первой серии экспериментов, во второй серии животным натощак после суточного голодания сначала вводили 1,3 мл напитка внутрижелудочно, а через 15 минут крысы получали углеводную нагрузку в той же дозе, что и в первой серии экспериментов. Аналогичная схема была использована по отношению к контрольным животным. Средняя дозировка напитка 1,3 мл рассчитана на среднюю массу животных с учетом опыта построения плана эксперимента группой зарубежных ученых [31].

Уровень гликемии определяли до углеводной нагрузки, а также спустя 30, 60, 90 и 120 мин после нее [32]. Концентрацию глюкозы выявляли в цельной крови с применением глюкометра Contour TS® (Ascensia Diabetes Care Holdings AG, Япония). Для этого медицинской иглой делали прокол по ходу хвостовой вены животного, далее подносили глюкометр со вставленной тест-полоской (Ascensia Diabetes Care Holdings AG, Япония), прибор автоматически отбирал нужное количество крови (15 мкл) для измерения глюкозы и выдавал результат на электронное табло исследовательского оборудования.

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 23 (Армонк, штат Нью-Йорк, США) (данные представлены в виде среднего значения и его стандартного отклонения). Учитывая небольшую выборку животных, достоверность полученных данных определяли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Для оценки статистической значимости изменений во времени внутри группы применяли критерий Фридмана.

Таблица 1. Биоактивные пептиды в белковых гидролизатах

Table 1. Bioactive peptides in protein hydrolysates

Пептид	Активность (по базе BioPer)	Содержание, мг/100 г гидролизата		
		Опытный образец, ферментированный BLC	Контрольный образец	Опытный образец, ферментированный Propionix LCSC
SY	ингибитор АПФ	$10,6000 \pm 0,0872^b$	$20,4000 \pm 0,0583^a$	$9,7600 \pm 0,0600^c$
	ингибитор дипептидилпептидазы-4			
VW	ингибитор АПФ	$1,3800 \pm 0,0735^c$	$7,5000 \pm 0,0447^b$	$20,1000 \pm 0,0600^a$
	антиоксидант			
	ингибитор дипептидилпептидазы-4			
SW	ингибитор альфаглюкозидазы	$1,1200 \pm 0,0800^c$	$3,0200 \pm 0,0970^b$	$7,2000 \pm 0,0447^a$
Общее содержание выявленных активных пептидов		$13,1000 \pm 0,1720^c$	$30,9000 \pm 0,1520^b$	$37,1000 \pm 0,0775^a$

Примечание: средние значения в строке без общего надстрочного индекса имеют достоверные различия ($p < 0,05$) при анализе с помощью однофакторного дисперсионного анализа и теста Тьюки.

² Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Электронный ресурс: <https://gm.coe.int/168007a6a8> Дата доступа 14.04.2023

³ Федеральный закон Российской Федерации от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». Электронный ресурс: <https://docs.cntd.ru/document/552045936> Дата доступа 14.04.2023

⁴ ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». М.: Стандартинформ, 2019. — 15 с.

⁵ РД-АПК 3.10.07.02–09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений» Электронный ресурс: <https://docs.cntd.ru/document/1200088317> Дата доступа 14.04.2023

3. Результаты и обсуждение

В исследуемом белковом гидролизате выявлено 3 биоактивных пептида с подтвержденной по базе BioPer ингибирующей ферменты дипептидилпептидазу-4 и альфаглюкозидазу активностью — SY (серин-тирозин), VW (валин-триптофан), SW (серин-триптофан).

Результаты оценки молекулярно-массового распределения пептидов в гидролизатах показали, что суммарно более высокое содержание пептидов наблюдалось с ингибирующей дипептидилпептидазу-4 активностью в гидролизате, полученном ферментацией желудков цыплят-бройлеров в сыворотке с добавлением пропионово-кислых бактерий (Таблица 1), что составило на 20% больше, чем у контрольного образца гидролизата.

Содержание данных активных пептидов в гидролизате, полученном ферментацией бифидобактериями, оказалось примерно в 3 раза меньше, чем в контрольном образце и образце с пропионовокислыми бактериями.

В связи с этим для дальнейшего моделирования рецептуры напитка использовали белковый гидролизат, полученный ферментацией пропионовокислыми бактериями.

Для проведения оптимизации и моделирования рецептуры напитка составлена база данных о компонентах рецептуры и получены балансовые уравнения (Таблица 2).

Таблица 2. Балансовые уравнения для моделирования рецептуры напитка

Table 2. Balance equations for modeling recipes of the beverage

Показатель	Уравнение
Содержание белка	$24,3 \cdot X_2 + 52 \cdot X_3 \leq 27$
Содержание жиров	$15 \cdot X_2 + 5,5 \cdot X_3$
Содержание углеводов	$10,2 \cdot X_2 + 12,5 \cdot X_3 + 3,5 \cdot X_4$
Содержание сухих веществ	$30 \cdot X_2 + 92 \cdot X_3 + 92 \cdot X_4 \leq 12$
Себестоимость продукта (функция цели)	$5 \cdot X_1 + 179 \cdot X_2 + 1200 \cdot X_3 + 800 \cdot X_4 \rightarrow \min$
Формирование единицы продукта	$X_1 + X_2 + X_3 + X_4 = 1$

В результате получены две рецептуры напитка (Таблица 3).

Таблица 3. Рецептуры напитка

Table 3. Recipes of the beverage

Компонент	Содержание компонента, кг /100 кг	
	Рецептура 1	Рецептура 2
Вода питьевая	69	56
Гидролизат белка	15	15
Сироп лактулозы	15	15
Какао-порошок	1	0
Лимонный сок	0	14

По полученным рецептурам в лабораторных условиях изготовлены напитки по технологии, представленной на схеме (Рисунок 2), и проведена их органолептическая оценка для выявления предпочтений потребителей по вкусу напитка, так как белковый гидролизат в обозначенной концентрации придает напитку горький привкус.

Для установления оптимального образца напитка по вкусу проводилась дегустация неподготовленными испытуемыми (потенциальными потребителями напитка), и при парном сравнении двух напитков испытуемым необходимо было выбрать напиток с наиболее приемлемым вкусом (в связи с тем, что гидролизат белка в такой высокой дозировке придает напитку горький привкус). Из 24 испытуемых 19 отдали предпочтение напитку с добавлением лимонного сока. В связи с этим для проведения последующего опыта на лабораторных животных принят напиток с лимонным соком как более приемлемый с точки зрения вкуса.

По результатам проведения глюкозотолерантного теста у животных контрольной и опытной групп в случае с применением напитка, а также без его использования, были построены графики, характеризующие различные этапы метаболизма глюкозы у здоровых животных и у крыс с экспериментальной патологией (Рисунки 3 и 4).

В контрольной группе животных при внутрижелудочном введении глюкозы в дозировке 2 г/кг без использования напитка наблюдалась классическая картина проведения глюкозотолерантного теста: резкое повышение уровня глюкозы в крови в 2,5 раза на 30 минуте исследования и постепенное снижение показателя вплоть до 120 минут (Рисунок 3). Однако обращает на себя внимание тот факт, что

значения гликемии натощак и к концу проведения теста не были идентичными, разница между ними составила 1,9 ммоль/л.

Повышение уровня глюкозы в крови на 30 минуте эксперимента незначительно отличалось между группами Г1 и Г2 ($p \geq 0,05$), так же, как и в начале эксперимента ($p \geq 0,05$).

Иная картина наблюдалась при проведении глюкозотолерантного теста у контрольных животных с использованием напитка (группа Г2) в следующие временные отметки. Снижение концентрации глюкозы начиная с 60 минуты исследования было более выраженным по отношению к группе Г1 ($p \leq 0,05$) и привело к тому, что показатель на 120 минуте был практически идентичен значению, полученному до углеводной нагрузки, и существенно отличался от группы Г1 ($p \leq 0,05$).

В группе крыс с экспериментальным сахарным диабетом как с использованием напитка, так и без него, наблюдалось идентичное повышение концентрации глюкозы в крови примерно в 1,5 раза (Рисунок 4).

В начальный момент времени результаты в группах Г3 и Г4 отличались незначительно ($p \geq 0,05$). В сравнении с контрольной группой животных, в Г3 и Г4 значения уровня глюкозы в крови крыс значительно различались на 30 минуте эксперимента ($p \leq 0,01$).

Учитывая то, что уровень гликемии натощак у данной группы имел чрезвычайно высокие значения, такое повышение можно считать значительным. Более того, в серии эксперимента у Г3 исследуемый показатель продолжил расти к 60 минуте и находился на плато вплоть до 90 минуты, затем незначительно снижился.

В эксперименте с использованием напитка в группе Г4 ситуация значительно отличалась от группы Г3 — начиная с 60 минуты наблюдалось снижение уровня гликемии ($p \leq 0,05$). К 120 минуте показатель приближался к уровню глюкозы в крови натощак и составлял $22,0 \pm 1,68$ ммоль/л, что значительно отличалось от контрольной группы Г3 ($p \leq 0,05$). Результаты расчета критерия Фридмана показали значимость изменений результатов внутри групп Г1, Г2 и Г4 во временной промежуток 30–120 мин при $p \leq 0,05$.

В контрольной группе животных площадь под кривой «Концентрация глюкозы — время» при использовании напитка (группа Г2) уменьшилась на 15,7% по сравнению с контролем (группа Г1), в экспериментальной группе животных при применении напитка (группа Г4) площадь уменьшилась на 23,4% по сравнению с контрольной группой Г3.

Результаты проведенных исследований наглядно демонстрируют, что напиток с добавлением белкового гидролизата помогает нормализовать уровень глюкозы в крови у здоровых животных, а также способствует более быстрому снижению данного показателя у крыс с экспериментальным сахарным диабетом в сравнении с животными, которым была дана только углеводная нагрузка.

Уровень сахара в крови у здоровых лабораторных животных в группе Г1 (без добавления напитка) повышался на 151% относительно начальных значений, что является более высоким показателем по сравнению с группой Г2 (с использованием напитка), где повышение составило 87%. При этом прирост уровня глюкозы в конечном измерении (120 мин) по отношению к начальному составил 65% у группы Г1 и 12% у группы Г2.

У больных животных в группе Г3 (без использования напитка) также наблюдался более значительный рост уровня сахара в крови — 61% относительно начальных значений, в то время как в группе Г4 (с применением напитка) это повышение составило 46%. Конечное измерение уровня глюкозы в крови у группы Г3 показало значение на 53% выше, чем в начальный момент, а у Г4 — на 17%.

Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов. Так, например, в работе авторов Du X. и др. (2022) была экспериментально подтверждена гипогликемическая активность гидролизата сывороточного белка из козьего молока, содержащего ингибиторы активности дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4), α -глюкозидазы и α -амилазы [33,34].

Проведены исследования группой зарубежных ученых, установивших влияние напитка на основе гидролизата сывороточного белка (15,6 г белка на 100 мл напитка) на уровень глюкозы в крови пациентов с сахарным диабетом. Данные исследования подтверждают эффективность напитка в снижении гипергликемии при 7-дневном курсе употребления 3 раза в день перед приемом пищи [31].

Также в работах некоторых ученых экспериментально выявлено и подтверждено положительное влияние лимонного сока на снижение уровня глюкозы в крови [35,36], однако дозировки его были более высокие, чем в полученном нами напитке. Стоит отметить, что не исключена возможность синергетического эффекта лимонного сока и активных пептидов гидролизата в снижении гликемического индекса, что требует дополнительных исследований.

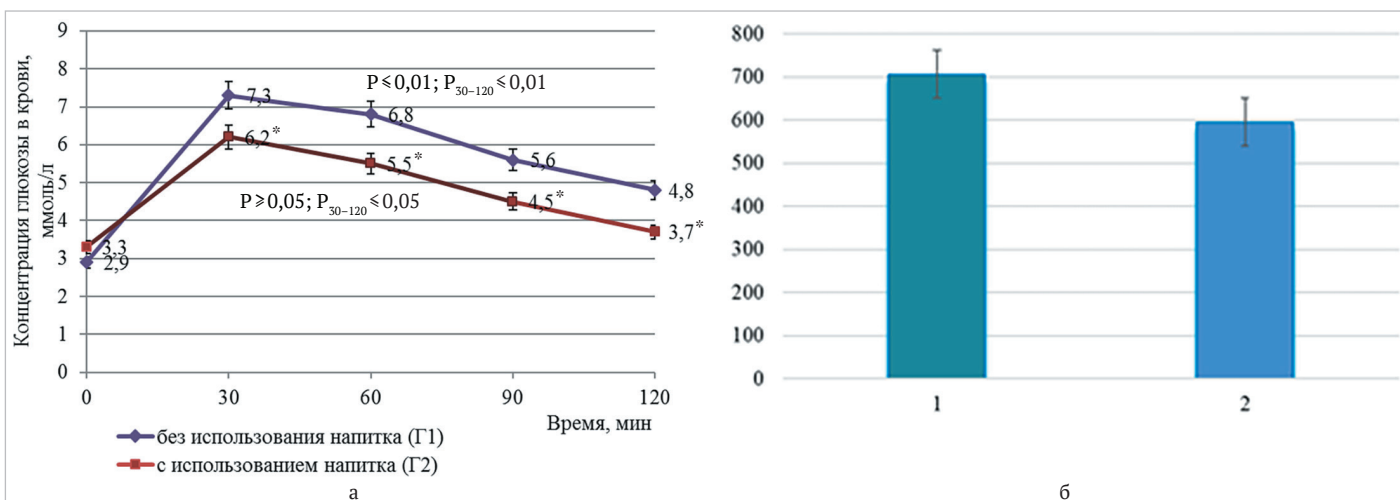


Рисунок 3. Результаты глюкозотолерантного теста контрольной группы животных:

а — динамика концентрации глюкозы в крови у крыс групп Г1 (контрольная группа животных без использования напитка) и Г2 (контрольная группа животных с использованием напитка);

б — площадь под кривой «Концентрация глюкозы — время» при глюкозотолерантном тесте в группах Г1(1) и Г2(2)

Figure 3. Results of the glucose tolerance test of the control group of animals: а — dynamics of the blood glucose concentration in the rats of the G1 group (control group of animals without using the beverage) and the G2 group (control group of animals with the use of the beverage); б — area under the curve “Glucose concentration — time” upon the glucose tolerance test in groups G1(1) and G2 (2)

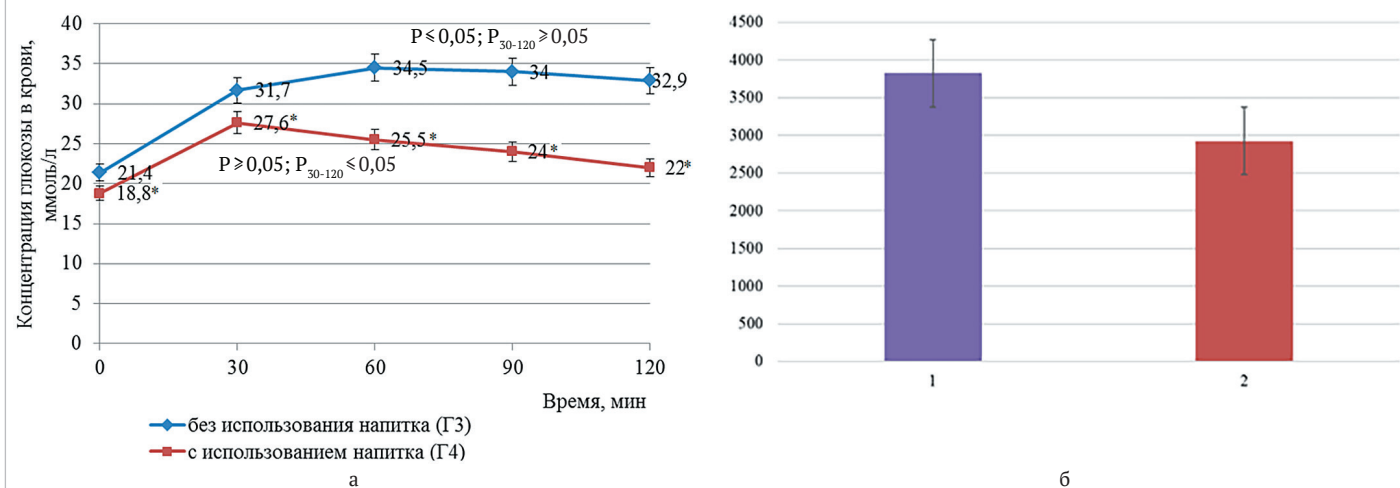


Рисунок 4. Результаты глюкозотолерантного теста опытной группы животных «с моделью диабета»:

а — динамика концентрации глюкозы в крови у крыс групп Г3 (опытная группа животных без использования напитка) и Г4 (опытная группа животных с использованием напитка);

б — площадь под кривой «Концентрация глюкозы — время» при глюкозотолерантном тесте в группах Г3(1) и Г4(2)

Figure 4. Results of the glucose tolerance test of the experimental group of animals with a model of diabetes: а — dynamics of the blood glucose concentration in the rats of the G3 group (the experimental group of animals without using the beverage) and the G4 group (the experimental group of animals with the use of the beverage); б — area under the curve “Glucose concentration — time” upon the glucose tolerance test in groups G3(1) and G4 (2)

Примечание: * — значимость изменений результатов между группами при $p \leq 0,05$; P — значимость изменений результатов во времени внутри группы при $p \leq 0,05$ по критерию Фридмана; P_{30-120} — значимость изменений результатов во времени (для временного промежутка 30–120 мин) внутри группы.

В многочисленных работах отмечено, что ферментацией вторичного пищевого сырья возможно получение гидролизатов с активными пептидами, обладающими различным физиологическим действием, в том числе гидролизатов, регулирующих ферментативные процессы в организме больных диабетом.

Полученные результаты исследований позволяют расширить применение вторичного сырья в виде молочной сыворотки и субпродуктов птицы для производства белковых гидролизатов с определенной биоактивностью, перспективных для лечения сахарного диабета.

4. Выводы

Результаты исследований пептидного состава белкового гидролизата показали, что в результате микробной ферментации желудков цыплят-бройлеров в молочной сыворотке за счет гидролиза образуются активные пептиды, которые влияют на снижение уровня сахара в крови — с ингибирующей дипептидилпептидазу-4 и α -амилазу активностью.

На основе полученного белкового гидролизата смоделирована рецептура специализированного напитка для диабетического питания. Оптимизированы две рецептуры в программе Excel (США), по которым были изготовлены напитки. По результатам органолептической оценки было выявлено, что лучшими показателями обладает напиток с добавлением лимонного сока.

Результаты исследований *in vivo* показали, что напиток на основе белкового гидролизата, полученного микробной ферментацией желудков цыплят-бройлеров в молочной сыворотке пропионовыми бактериями, и содержащий в составе биоактивные пептиды, эффективен для снижения уровня глюкозы крови у лабораторных животных.

Однако, учитывая тот факт, что разные люди по-разному реагируют на одну и ту же диету, необходимы клинические испытания на людях, чтобы увидеть реальный эффект от приема разработанного напитка для контроля гликемии у пациентов с сахарным диабетом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, E.M. (2021). Identification of dipeptidyl peptidase IV(DPP-IV) inhibitory peptides from vegetable protein sources. *Food Chemistry*, 354, Article 129473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129473>
- Vaskovsky, A.M., Chvanova, M.S., Rebezov, M.B. (2020). Creation of digital twins of neural network technology of personalization of food products for diabetics. *Conference Proceedings — 4th Scientific School on Dynamics of Complex Networks and their Application in Intellectual Robotics, DCNAIR*, 251–253, Article 9216776. <https://doi.org/10.1109/DCNAIR50402.2020.9216776>
- Тутельян, В.А., Шарафетдинов, Х.Х., Лапик, И.А., Воробьева, И.С., Суханов, Б.П. (2014). Приоритеты в разработке специализированных пищевых продуктов оптимизированного состава для больных сахарным диабетом 2 типа. *Вопросы питания*, 83(6), 41–51. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2014-00060>
- Шарафетдинов, Х.Х., Плотникова, О.А., Назарова, А.М., Кондратьева, О.В. (2017). Специализированные пищевые продукты с модифицированным углеводным профилем в коррекции метаболических нарушений при сахарном диабете 2 типа. *Вопросы питания*, 86(6), 56–66. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2017-00006>
- Кочеткова, А.А., Воробьева, И.С., Воробьева, В.М., Шарафетдинов, Х.Х., Плотникова, О.А., Пилипенко, В.В. и др. (2018). Специализированные пищевые продукты с модифицированным углеводным профилем для диетической коррекции рациона больных сахарным диабетом 2 типа. *Вопросы питания*, 87(6), 76–88. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10069>
- Hemker, A.K., Nguyen, L.T., Karwe, M., Salvi, D. (2020). Effects of pressure-assisted enzymatic hydrolysis on functional and bioactive properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product protein hydrolysates. *LWT*, 122, Article 109003. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.109003>
- Sanchez, A., Vazquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., Kumar, V. (2020). A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 139–150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- Elam, E., Feng, J., Lv, Y.-M., Ni, Z.-J., Sun, P., Thakur, K. et al. (2021). Recent advances on bioactive food derived anti-diabetic hydrolysates and peptides from natural resources. *Journal of Functional Foods*, 86, Article 104674. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104674>
- Chen, F., Jiang, H., Lu, Y., Chen, W., Huang, G. (2019). Identification and *in silico* analysis of antithrombotic peptides from the enzymatic hydrolysates of *Tenebrio molitor* larvae. *European Food Research and Technology*, 245, 2687–2695. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03381-2>
- Рязанцева, К.А., Агаркова, Е.Ю., Кручинин, А.Г. (2019). Гидролизаты молочной сыворотки как ингредиенты для повышения функциональных свойств молочных продуктов. *Молочная река*, 4(76), 26–28.
- Рязанцева, К.А. (2020). Гидролизаты сывороточного белка как источник биологически активных пептидов для включения в функциональные продукты питания. *Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством*, 1(1), 475–480. <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-475-480>
- Chen, R., Chen, G. (2022). Personalized nutrition for people with diabetes and at risk of diabetes has begun. *Journal of Future Foods*, 2(3), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.06.001>
- Kapoor, M.P., Ishihara, N., Okubo, T. (2016). Soluble dietary fibre partially hydrolysed guar gum markedly impacts on postprandial hyperglycaemia, hyperlipidaemia and incretins metabolic hormones over time in healthy and glucose intolerant subjects. *Journal of Functional Foods*, 24, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.008>
- Salas-Salvado, J., Becerra-Tomás, N., Papandreou, C., Bullo, M. (2019). Dietary patterns emphasizing the consumption of plant foods in the management of type 2 diabetes: A narrative review. *Advances in Nutrition*, 10(Suppl 4), S320–S331. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy102>
- Xu, R., Bu, Y.-G., Zhao, M.-L., Tao, R., Luo, J., Li, Y. (2020). Studies on antioxidant and α -glucosidase inhibitory constituents of chinese toon bud (*Toona sinensis*). *Journal of Functional Foods*, 73, Article 104108. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104108>
- Akinyede, A.I., Ayibowu, E.O., Fakologbon, T., Awolu, O.O., Fagbemi, T.N. (2023). Nutritional assessment, glycemic indices and anti-diabetic potentials of dough meal generated from optimized blends of matured plantain, soya cake and wheat bran flours. *Journal of Future Foods*, 3(4), 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.03.008>
- Oyedemi, S.O., Oyedemi, B.O., Ijeh, I.I., Ohanyerem, P.E., Cooposamy, R.M., Aiyegoro, O.A. (2017). Alpha-amylase and antioxidative inhibition capacity of some anti-diabetic plants used by the traditional healers in Southeastern Nigeria. *The Scientific World Journal*, 2017, Article 3592491. <https://doi.org/10.1155/2017/3592491>
- Wang, C. Y., Zheng, L., Su, G., Zeng, X.-A., Sun, B., Zhao, M. (2020). Evaluation and exploration of potentially bioactive peptides in casein hydrolysates against liver oxidative damage in STZ/HFD induced diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(8), 2393–2405. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07687>
- Wang, Q., Chen, R., Zhang, C., Inam-U-Llah, Piao, F., Shi, X. (2019). NGF protects bone marrow mesenchymal stem cells against 2,5-hexanedione-induced apoptosis *in vitro* via Akt/Bad signal pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 457(1–2), 133–143. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03518-7>
- Lunt, H., Carr, A.C., Heenan, H.F., Vlasiuk, E., Zawari, M., Prickett, T. et al. (2023). People with diabetes and hypovitaminosis C fail to conserve urinary vitamin C. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology*, 31, Article 100316. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2023.100316>
- Рябцева, С.А., Храмцов, А.Г., Будкевич, Р.О., Анисимов, Г.С., Чукло, А.О., Шпак, М.А. (2020). Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы. *Вопросы питания*, 89(2), 5–20. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10012>
- Табаторович, А.Н., Резниченко, И.Ю. (2019). Разработка и оценка качества диабетического желеинового мармелада «Каркаде», обогащенного янтарной кислотой. *Техника и технология пищевых производств*, 49(2), 320–329. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2019-2-320-329>
- Zinina, O., Merenkova, S., Galimov, D. (2021). Optimization of microbial hydrolysis parameters of poultry by-products using probiotic microorganisms to obtain protein hydrolysates. *Fermentation*, 7(3), Article 122. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030122>
- Khvostov, D.V., Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M. (2022). Methodology for the identification of bioactive and marker peptides in the organs of cattle and pigs. *Theory and Practice of Meat Processing*, 7(2), 118–124. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-2-118-124>
- Tsugawa, H., Nakabayashi, R., Mori, T., Yamada, Y., Takahashi, M., Rai, A. et al. (2019). A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. *Nature Methods*, 16, 295–298. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0358-2>
- Karkischenko, V.N., Skvortsova, V.I., Gasanov, M.T., Fokin, Y.V., Nesterov, M.S., Petrova, N.V. et al. (2021). Inhaled [D-Ala²]-Dynorphin 1–6 prevents hyperacetylation and release of high mobility group Box 1 in a mouse model of acute lung injury. *Journal of Immunology Research*, 2021, Article 4414544. <https://doi.org/10.1155/2021/4414544>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(25), Article 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- PeptideRanker. Retrieved from <http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/> Accessed November 17, 2022
- Можейко, Л.А. (2013). Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета Часть I. Аллоксановый диабет. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 3(43), 26–29.
- Smith, K., Taylor, G.S., Brunsgaard, L.H., Walker, M., Davies, K.A.B., Stevenson, E. J. (2022). Thrice daily consumption of a novel, premeal shot containing a low dose of whey protein increases time in euglycemia during 7 days of free-living in individuals with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 10(3), Article e002820. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2022-002820>
- Горячева, М.А., Макарова, М.Н. (2016). Особенности проведения глюкозотолерантного теста у мелких лабораторных грызунов (мыши и крысы). *Международный вестник ветеринарии*, 3, 155–159.
- Агаркова, Е.Ю., Рязанцева, К.А., Кручинин, А.Г. (2020). Противодиабетическая активность белков молочной сыворотки. *Техника и технология пищевых производств*, 50(2), 306–318. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-2-306-318>
- Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Wang, X., Wang, H. (2022). Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. *LWT*, 159, Article 113257. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113257>
- Yagi, M., Uenaka, S., Ishizaki, K., Sakiyama, C., Takeda, R., Yonei, Y. (2020). Effect of the postprandial blood glucose on lemon juice and rice intake. *Glycative Stress Research*, 7(2), 174–180. https://doi.org/10.24659/gsr.7.2_174
- Avila, F., Jimenez-Aspee, F., Cruz, N., Gomez, C., Gonzalez, M. A., Ravello, N. (2019). Additive effect of maqui (*Aristotelia chilensis*) and lemon (*Citrus x limon*) juice in the postprandial glycemic responses after the intake of high glycemic index meals in healthy men. *NFS Journal*, 17, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.09.001>

REFERENCES

- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, E.M. (2021). Identification of dipeptidyl peptidase IV(DPP-IV) inhibitory peptides from vegetable protein sources. *Food Chemistry*, 354, Article 129473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129473>
- Vaskovsky, A.M., Chvanova, M.S., Rebezov, M.B. (2020). Creation of digital twins of neural network technology of personalization of food products for diabetics. *Conference Proceedings — 4th Scientific School on Dynamics of Complex Networks and their Application in Intellectual Robotics, DCNAIR*, 251–253, Article 9216776. <https://doi.org/10.1109/DCNAIR50402.2020.9216776>
- Tutelyan, V.A., Sharafetdinov, Kh. Kh., Lapik, I.A., Vorobyeva, I.S., Sukhanov, B.P. (2014). Priorities in the development of specialized food products with optimized composition for patients with type 2 diabetes mellitus. *Voprosy Pitaniia*, 83(6), 41–51. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2014-00060> (In Russian)
- Sharafetdinov, Kh. Kh., Plotnikova, O.A., Nazarova, A.M., Kondratieva, O.V. (2017). Specialized foods with a modified carbohydrate profile in the correction of metabolic disorders in type 2 diabetes. *Voprosy Pitaniia*, 86(6), 56–66. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2017-00006> (In Russian)
- Kochetkova, A.A., Vorobyeva, I.S., Vorobyeva, V.M., Sharafetdinov, Kh. Kh., Plotnikova, O.A., Piliipenko, V.V. et al. (2018). Specialized food products with modified carbohydrate profile for dietary correction of diet of patients with type 2 diabetes. *Voprosy Pitaniia*, 87(6), 76–88. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10069> (In Russian)
- Hemker, A.K., Nguyen, L.T., Karwe, M., Salvi, D. (2020). Effects of pressure-assisted enzymatic hydrolysis on functional and bioactive properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product protein hydrolysates. *LWT*, 122, Article 109003. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.109003>
- Sanchez, A., Vazquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., Kumar, V. (2020). A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *Inter-*

- national Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 139–150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
9. Elam, E., Feng, J., Lv, Y.-M., Ni, Z.-J., Sun, P., Thakur, K. et al. (2021). Recent advances on bioactive food derived anti-diabetic hydrolysates and peptides from natural resources. *Journal of Functional Foods*, 86, Article 104674. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104674>
 10. Chen, F., Jiang, H., Lu, Y., Chen, W., Huang, G. (2019). Identification and *in silico* analysis of antithrombotic peptides from the enzymatic hydrolysates of *Tenebrio molitor* larvae. *European Food Research and Technology*, 245, 2687–2695. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03381-2>
 11. Ryazantseva, K.A., Agarkova, E. Yu., Kruchinin, A.G. (2019). Whey hydrolysates as ingredients for improving the functional properties of dairy products. *Milk River*, 4(76), 26–28. (In Russian)
 12. Ryazantseva, K.A. (2020). Whey protein hydrolysates as the source of peptides biological activity for their incorporation into functional food products. *Actual Issues of the Dairy Industry, Cross-Industry Technologies and Quality Management Systems*, 1(1), 475–480. <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-475-480> (In Russian)
 13. Chen, R., Chen, G. (2022). Personalized nutrition for people with diabetes and at risk of diabetes has begun. *Journal of Future Foods*, 2(3), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.06.001>
 14. Kapoor, M.P., Ishihara, N., Okubo, T. (2016). Soluble dietary fibre partially hydrolysed guar gum markedly impacts on postprandial hyperglycaemia, hyperlipidaemia and incretins metabolic hormones over time in healthy and glucose intolerant subjects. *Journal of Functional Foods*, 24, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.008>
 15. Salas-Salvadó, J., Becerra-Tomás, N., Papandreou, C., Bullo, M. (2019). Dietary patterns emphasizing the consumption of plant foods in the management of type 2 diabetes: A narrative review. *Advances in Nutrition*, 10(Suppl 4), S320–S331. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy102>
 16. Xu, R., Bu, Y.-G., Zhao, M.-L., Tao, R., Luo, J., Li, Y. (2020). Studies on antioxidant and α -glucosidase inhibitory constituents of chinese toon bud (*Toona sinensis*). *Journal of Functional Foods*, 73, Article 104108. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104108>
 17. Akinyede, A.I., Ayibowu, E.O., Fakologbon, T., Awolu, O.O., Fagbemi, T.N. (2023). Nutritional assessment, glycemic indices and anti-diabetic potentials of dough meal generated from optimized blends of matured plantain, soya cake and wheat bran flours. *Journal of Future Foods*, 3(4), 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.03.008>
 18. Oyedemi, S.O., Oyedemi, B.O., Ijeh, I.I., Ohanyerem, P.E., Cooposamy, R.M., Aiyegoro, O.A. (2017). Alpha-amylase and antioxidative inhibition capacity of some anti-diabetic plants used by the traditional healers in Southeastern Nigeria. *The Scientific World Journal*, 2017, Article 3592491. <https://doi.org/10.1155/2017/3592491>
 19. Wang, C. Y., Zheng, L., Su, G., Zeng, X.-A., Sun, B., Zhao, M. (2020). Evaluation and exploration of potentially bioactive peptides in casein hydrolysates against liver oxidative damage in STZ/HFD induced diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(8), 2393–2405. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07687>
 20. Wang, Q., Chen, R., Zhang, C., Inam-U-Allah, Piao, F., Shi, X. (2019). NGF protects bone marrow mesenchymal stem cells against 2,5-hexanedione-induced apoptosis *in vitro* via Akt/Bad signal pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 457(1–2), 133–143. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03518-7>
 21. Lunt, H., Carr, A.C., Heenan, H.F., Vlasiuk, E., Zawari, M., Prickett, T. et al. (2023). People with diabetes and hypovitaminosis C fail to conserve urinary vitamin C. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology*, 31, Article 100316. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2023.100316>
 22. Ryabtseva, S.A., Khramtsov, A.G., Budkevich, R.O., Anisimov, G.S., Chuklo, A.O., Shpak, M.A. (2020). Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose. *Voprosy Pitaniya*, 89(2), 5–20. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10012> (In Russian)
 23. Tabatorovich, A.N., Reznichenko, I. Yu. (2019). Formulation and quality assessment of diabetic jelly marmalade 'Karkade' fortified with succinic acid. *Food Production: Techniques and Technology*, 49(2), 320–329. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2019-2-320-329> (In Russian)
 24. Zinina, O., Merenkova, S., Galimov, D. (2021). Optimization of microbial hydrolysis parameters of poultry by-products using probiotic microorganisms to obtain protein hydrolysates. *Fermentation*, 7(3), Article 122. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030122>
 25. Khvostov, D.V., Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M. (2022). Methodology for the identification of bioactive and marker peptides in the organs of cattle and pigs. *Theory and Practice of Meat Processing*, 7(2), 118–124. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-2-118-124>
 26. Tsugawa, H., Nakabayashi, R., Mori, T., Yamada, Y., Takahashi, M., Rai, A. et al. (2019). A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. *Nature Methods*, 16, 295–298. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0358-2>
 27. Karkischenko, V.N., Skvortsova, V.I., Gasanov, M.T., Fokin, Y.V., Nesterov, M.S., Petrova, N.V. et al. (2021). Inhaled [D-Ala2]-Dynorphin 1–6 prevents hyperacetylation and release of high mobility group Box 1 in a mouse model of acute lung injury. *Journal of Immunology Research*, 2021, Article 4414544. <https://doi.org/10.1155/2021/4414544>
 28. Minkiewicz, P., Iwaniak, A., Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), Article 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
 29. PeptideRanker. Retrieved from <http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/> Accessed November 17, 2022
 30. Mozheyko, L.A. (2013). Experimental models for studying diabetes mellitus Part I. Alloxan diabetes. *Journal of the Grodno State Medical University*, 3(43), 26–29. (In Russian)
 31. Smith, K., Taylor, G.S., Brunsgaard, L.H., Walker, M., Davies, K.A.B., Stevenson, E. J. et al. (2022). Thrice daily consumption of a novel, premeal shot containing a low dose of whey protein increases time in euglycemia during 7 days of free-living in individuals with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 10(3), Article e002820. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2022-002820>
 32. Goryacheva, M.A., Makarova, M.N. (2016). Special aspects of glucose tolerance test in small laboratory rodents (mice and rats). *International Bulletin of Veterinary Medicine*, 3, 155–159. (In Russian)
 33. Agarkova, E. Yu., Ryazantseva, K.A., Kruchinin, A.G. (2020). Anti-diabetic activity of whey proteins. *Food Processing: Techniques and Technology*, 50(2), 306–318. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-2-306-318> (In Russian)
 34. Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Wang, X., Wang, H. (2022). Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. *LWT*, 159, Article 113257. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113257>
 35. Yagi, M., Uenaka, S., Ishizaki, K., Sakiyama, C., Takeda, R., Yonei, Y. (2020). Effect of the postprandial blood glucose on lemon juice and rice intake. *Glycative Stress Research*, 7(2), 174–180. https://doi.org/10.24659/gsr.7.2_174
 36. Avila, F., Jimenez-Aspee, F., Cruz, N., Gomez, C., Gonzalez, M. A., Ravello, N. (2019). Additive effect of maqui (*Aristotelia chilensis*) and lemon (*Citrus x limon*) juice in the postprandial glycemic responses after the intake of high glycemic index meals in healthy men. *NFS Journal*, 17, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.09.001>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Зинина Оксана Владимировна — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, кафедра «Пищевые и биотехнологии», Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет) 454080, Челябинск, пр. Ленина, 76 Тел.: +7–906–871–36–81 E-mail: zininaov@susu.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4817-1645 * автор для контактов	Oksana V. Zinina , Candidate of Agricultural Sciences, Docent, Department of Food and Biotechnology, South Ural State University (National Research University) 76, Lenin av., 454080, Chelyabinsk, Russia Tel.: +7–906–871–36–81 E-mail: zininaov@susu.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4817-1645 * corresponding author
Николина Анна Дмитриевна — лаборант, кафедра «Пищевые и биотехнологии», Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), 454080, Челябинск, пр. Ленина, 76 Тел.: +7–909–085–91–58 E-mail: nikolina2001@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0988-0695	Anna D. Nikolina , Laboratory Assistant, Department of Food and Biotechnology, South Ural State University (National Research University) 76, Lenin av., 454080, Chelyabinsk, Russia Tel.: +7–909–085–91–58 E-mail: nikolina2001@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0988-0695
Хвостов Даниил Владиславович — кандидат технических наук, научный сотрудник, лаборатория «Молекулярной биологии и биоинформатики», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7–495–676–79–81 E-mail: d.hvostov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3445-4559	Daniil V. Khvostov , Candidate of Technical Sciences Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbатов Federal Research Centre for Food Systems 26, Talalikhin str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7–495–676–79–81 E-mail: d.hvostov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3445-4559
Ребезов Максим Борисович — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7–999–900–23–65 E-mail: rebezov@ya.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0003-0857-5143	Maksim B. Rebezov , Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Chief Researcher, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhin str., Moscow, 109316, Russia Tel.: +7–999–900–23–65 E-mail: rebezov@ya.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0003-0857-5143
Завьялов Сергей Николаевич — ассистент, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Южно-Уральский государственный медицинский университет 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64 Тел.: +7–951–465–21–64 E-mail: chegresssss@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1413-6887	Sergey N. Zavyalov , Assistant, Department of Histology, Embryology and Cytology, South-Ural State Medical University 64, Vorovsky str., 454092, Chelyabinsk, Russia Tel.: +7–951–465–21–64 E-mail: chegresssss@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1413-6887
Ахмедзянов Роман Вильданович — студент, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Южно-Уральский государственный медицинский университет 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64 Тел.: +7–922–635–23–99 E-mail: akhmedroman@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0009-0008-9833-3554	Roman V. Akhmedzyanov , Student, Department of Histology, Embryology and Cytology, South-Ural State Medical University 64, Vorovsky str., 454092, Chelyabinsk, Russia Tel.: +7–922–635–23–99 E-mail: akhmedroman@bk.ru ORCID: https://orcid.org/0009-0008-9833-3554
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-449-456>

Поступила 23.05.2023

Поступила после рецензирования 17.10.2023

Принята в печать 24.10.2023

© Волончук С. К., Мазалевский В. Б., Станкевич С. В., Чекрыга Г. П., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА КОРМОВУЮ СМЕСЬ ПОДСОЛНЕЧНОГО ЖМЫХА И МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Волончук С. К.*, Мазалевский В. Б., Станкевич С. В., Чекрыга Г. П.

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, р. п. Краснообск, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

жмых, сыворотка В настоящее время для кормления крупного рогатого скота широко используют побочные продукты основного производства в виде жмыха, шрота, отрубей, молочной сыворотки. Несмотря на входящие в их состав белок, жиры, углеводы, минеральные вещества и клетчатку, существует проблема низкой усвояемости этих питательных веществ. Кроме того, побочные продукты часто неблагополучны по микробиологическим показателям. Для решения данной проблемы используются различные физические, механические воздействия. В статье приведены результаты исследований влияния ультразвука (УЗ) на кормовую смесь подсолнечного жмыха и молочной сыворотки. Ультразвук — это волновые колебания с частотами более 20 кГц. Ультразвуковые волны распространяются в твердых, жидких и газообразных средах, обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологических явлений. При УЗ-воздействии на смесь образуются пузырьки, при схлопывании которых выделяется большое количество энергии. Эта энергия расходуется на разрушение крупных частиц жмыха с размерами частиц 1370,8–2776,6 мкм в сухом жмыхе до 1,8–300,0 мкм в суспензии. Подавляющее большинство (60–75%) частиц имеют размеры от 11 до 30 мкм при продолжительности УЗ-обработки 20–30 мин. Это видно на фотографиях смеси под микроскопом. При этом из простой смеси компонентов образуется гомогенная гелеобразная масса, содержащая белок, жир, клетчатку, сахара, что существенно улучшает процесс усвоения животными структурированных пищевых веществ жмыха. Выявлено уменьшение содержания белка в суспензии с 10,20% до 6,65% в соотношении компонентов от 1:4 до 1:8. Установлены температурно-временные режимы для соотношений компонентов жмых/сыворотка. Оптимальная температура составляла 60–70 °С, время обработки — 20 минут. При всех временных значениях в смеси с соотношением 1:8 температура была ниже вследствие уменьшения вязкости образующейся суспензии. Под действием ультразвука происходит микробная инактивация, что важно для здоровья и продуктивности животных. В результате статистической обработки показателей процесса установлена область оптимальных значений переменных факторов, при которых происходит снижение микробиологической контаминации смеси.

Received 23.05.2023

Accepted in revised 17.10.2023

Accepted for publication 24.10.2023

© Volonchuk S. K., Mazalevskiy V. B., Stankevich S. V. Chekryga G. P., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

THE EFFECT OF ULTRASOUND ON THE FEED MIXTURE OF SUNFLOWER CAKE AND WHEY

Sergey K. Volonchuk*, Viktor B. Mazalevskiy, Svetlana V. Stankevich, Galina P. Chekryga

Siberian Federal Scientific Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Russia

KEY WORDS:

cake, milk whey,
ultrasound, cavitation,
feed additive, safety

ABSTRACT

At present, secondary products of the main production in the form of cake, oil meal, bran and whey are widely used for feeding cattle. Despite the presence of protein, fats, carbohydrates, minerals and fiber in their composition, there is a problem of low assimilability of these nutrients. Moreover, secondary products are often unsafe in terms of microbiological parameters. To solve this problem, various physical and mechanical impacts are used. The paper presents the results of the study of an ultrasound effect on the feed mixture of sunflower cake and whey. Ultrasound is wave oscillations with frequencies higher than 20 kHz. Ultrasound waves propagate in solid, liquid and gas media, have a high mechanical energy and cause several physical, chemical and biological phenomena. When ultrasound impacts a mixture, bubbles are formed and large amounts of energy are emitted upon their collapse. This energy is expended on destruction of large particles of cake with particle sizes of 1370.8–2776.6 µm in the dry cake and up to 1.8–300.0 µm in the suspension. The overwhelming majority (60–75%) of particles have sizes of 11 to 30 µm when duration of the ultrasound treatment is 20–30 min. This can be seen in the photographs of the mixture under a microscope. With that, the homogeneous gel-like mass containing protein, fat, fiber and sugars is formed from a simple mixture of components, which significantly improves the process of assimilation of structured nutrients of cake by animals. A decrease in the protein content from 10.20% to 6.65% has been revealed in the suspension with a component ratio of 1:4 to 1:8. Temperature-time regimes for ratios of the cake/whey components have been established. The optimal temperature was 60–70 °C, treatment time was 20 min. A temperature was lower in the mixture with a ratio of 1:8 for all time periods due to a decrease in viscosity of the formed suspension. Microbial inactivation occurs under the impact of ultrasound, which is important for animal health and productivity. As a result of the statistical processing of process indicators, a range was established for optimal values of variable factors at which a decrease in the microbiological contamination of the mixture takes place.

1. Введение

В современном обществе наблюдается постоянный рост потребления молока и продуктов его переработки благодаря их высокой питательной ценности. На увеличение производства молока существенное влияние оказывает порода продуктивных животных, а также

корма, используемые для их кормления. Качество кормов зависит от их полноценности и безопасности. Эти две составляющие представляют интерес для научных исследований. Важная роль в процессе создания эффективных кормов принадлежит продуктам, получаемым в процессе переработки сельскохозяйственного сырья, побочным

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Волончук, С. К., Мазалевский, В. Б., Станкевич, С. В., Чекрыга, Г. П. (2023). Влияние ультразвука на кормовую смесь подсолнечного жмыха и молочной сыворотки. *Пищевые системы*, 6(4), 449–456. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-449-456>

FOR CITATION: Volonchuk, S. K., Mazalevskiy, V. B., Stankevich, S. V., Chekryga, G. P. (2023). The effect of ultrasound on the feed mixture of sunflower cake and whey. *Food Systems*, 6(4), 449–456. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-449-456>

продуктам основного производства, которые в свою очередь являются вторичными ресурсами для трансфера технологий. Из научных публикаций известно, что жмых, полученный после прессования семян различных культур, относится к отходам производства растительного масла, содержащим 4–10% жира, а также больше, чем в самих семенах, количество белка (30–35%) и клетчатку. По аминокислотному составу и биологической ценности белки жмыхов превосходят белки зерновых злаков, содержащих 10% белка для 5 класса зерна пшеницы по ГОСТ 9353–2006¹. Они содержат большее количество лизина, метионина, цистина и триптофана. Жмыхи включают в себя 6–7% минеральных веществ; кальция и фосфора в них значительно больше, чем в зерновых кормах [1]. Ультразвуковой обработкой можно модифицировать структуру жмыха с целью повышения его питательной ценности [2].

Учитывая высокие концентрации сырого жира в жмыхе [3], ученые доказали перспективность добавки жмыха для регулирования содержания жирных кислот в рубце животных. Исследование по включению жмыха в рацион молодых кур показало снижение затрат на корма и повышение экономической эффективности [4].

По сравнению с семенами, подсолнечные жмыхи имеют в своем составе больше клетчатки (31,88% и 12,64% для образцов в виде гранул) [5]. Ввиду высокого содержания белка в жмыхе его вводят в рацион кормления молодняка и взрослых животных в количестве, соответствующем современным нормативам.

Из жмыха подсолнечника перед употреблением рекомендуется удалить хлорогеновую кислоту (CGA), которая влияет на его качество [6,7]. Особенно ценным является белок подсолнечного жмыха. Установлено, что включение в рацион животных подсолнечного жмыха линейно увеличивало следующие показатели (при $p < 0,05$): общее содержание липидов, белка и холестерина в мясе, влагоудерживающую способность. В корма можно включать до 21% жмыха [8].

Ультразвуковая (УЗ) обработка способствует повышению выхода белка из жмыхов и улучшению условий для протекания этого процесса. В оптимизированных условиях были получены изоляты с содержанием белка 94,04–0,77 г/100 г и выходом 43,6–0,97% [9].

Важно отметить, что жмыхи содержат значительное количество витаминов группы В [10,11].

Пластины жмыха предварительного размалывают. При этом в связи с высокой гигроскопичностью он поглощает влагу, что ведет к разложению триглицеридов на жирные кислоты и глицерин, которые окисляются грибами и бактериями, содержащимися в жмыхе, вследствие чего он становится непригодным для кормления животных. Поэтому молотый жмых не подлежит длительному хранению. Также стоит отметить, что он имеет свойство закисать [10,11,12]. Кроме того, усвояемость физиологически ценных веществ жмыха, заключенных в крупных агрегациях после помола, является неполной [10,11,12].

Нами была поставлена задача создать кормовую добавку повышенной ценности, не имеющую указанных недостатков. В результате анализа литературных источников был выбран метод ультразвукового воздействия на компоненты добавки. Данный метод оказался эффективным при изготовлении целого ряда продуктов из различного сырья. Он успешно применялся в процессе экстракции белка из семян тыквы [9], при получении зернового сырья и продуктов его переработки для создания кормовых добавок в рацион кормов животных [10,11], а также при производстве кормовых продуктов на основе поликомпонентных растительно-минеральных смесей [12].

Механизм взаимодействия между кавитацией и пищевыми средами, подробный анализ физико-химических эффектов акустической кавитации представлен в работе [13].

При обосновании метода основным положением является то, что все виды механической и другие виды обработки сырья, связанные с приданием отдельным компонентам требуемой дисперсности или необходимых реологических свойств, не нарушают принципа суперпозиции в отношении исходных ингредиентов, биологически важных пищевых веществ [14].

Кормовая добавка из смеси подсолнечного жмыха с водой, обработанной ультразвуком, была получена в результате экспериментальных исследований в Оренбургском ГАУ. По итогам исследований было установлено, что переваримость сухого вещества превышала показатель натуральных кормов на 3,6–5,8% [10]. На повышение усвояемости сухого вещества жмыха указывают ряд публикаций. Так, в работе [15] говорится о том, что скорость разложения растворимой фракции (фракция В) и общее газообразование линейно снижались

со включением подсолнечного жмыха в рацион животных. Значения рН в ротовой жидкости были выше для уровней 0, 200 и 600 г/кг⁻¹ подсолнечного жмыха.

Исследованиями установлено, что кавитационная обработка при разных режимах оказывает определенное влияние на химический состав, на концентрацию основных питательных веществ и на переваримость сухого вещества сырья *in vitro*. В частности, количество сырой клетчатки снизилось в подсолнечном жмыхе на 15,4–24,12%; сырого жира — на 6,4–11,2%; содержание сахаров в подсолнечном жмыхе увеличилось на 18,8–25,0%. Переваримость сухого вещества подсолнечного жмыха переработанного превышала показатель натурального на 3,6–5,8% [16,17].

Как положительный момент стоит отметить использование муки из семян подсолнечника, богатой белком, клетчаткой и антиоксидантами, полученной после отделения подсолнечного масла, в рецептуре печенья. Это значительно увеличило содержание белка в печенье, а также повысило ТРС (общее содержание фенолов) и антиоксидантную способность продукта [18].

Известно, что ультразвук (УЗ) — это волновые колебания с частотами более 20 000 колебаний в секунду (20 кГц). УЗ-волны распространяются в твердых, жидких и газообразных средах, обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологических явлений. За счет эффекта кавитации происходит улучшение физико-химических свойств, извлечение биологически важных пищевых веществ из пищевого сырья и отходов его переработки. Ультразвуковая обработка относится к категории экологически чистых технологий из-за нетоксичности последствий воздействия исполнительного механизма на сырье [19].

Воздействие определенных частот ультразвуковых колебаний способно вызывать деполимеризацию органелл микробных клеток. Поддействием ультразвука в жидкой среде клетки возникает процесс кавитации. Кавитация — это образование и схлопывание пузырьков газов, сопровождающееся созданием внутри клетки высокого давления (до 10 000 атм), что приводит к разрыву клеточной оболочки и, как следствие, к гибели клетки. Благодаря бактерицидному эффекту действия ультразвука, в настоящее время УЗ-технологии применяют для стерилизации пищевых продуктов (молоко, фруктовые соки, вина). УЗ-обработка является альтернативой используемым для повышения микробиологической безопасности синтетическим химикатам, которые, хотя и выполняют свою функцию, являются небезопасными для здоровья животных и человека [19].

В качестве второго компонента кормовой добавки применяли молочную сыворотку, которая в больших количествах образуется при переработке молока, но мало используется в дальнейшем. Следует отметить тот факт, что большая часть сыворотки сливается в почву, водоемы, тем самым загрязняя их и ухудшая экологическую обстановку. Она содержит до 94% воды, 0,5% белка, 0,1% жира, имеет кислотность 5,5 рН единиц [20,21] и может повысить питательную ценность корма. Однако из патента № 2154386 РФ «Способ получения молочно-растительной кормовой добавки» известно, что срок хранения сыворотки составляет не более двух суток при температуре +6 °С. Это нужно учитывать при ее использовании.

Целью работы являлось исследование влияния ультразвукового воздействия на кормовую смесь жмыха подсолнечного и сыворотки молочной.

Для выполнения поставленной задачи необходимо было изучить режимы ультразвуковой обработки смеси жмыха и молочной сыворотки, а также их влияние на структурные показатели компонентов и микробиологическую безопасность.

2. Объекты и методы

Работа проводилась в лаборатории трансфера технологий отдела пищевых систем и биотехнологий СФНЦА РАН. В процессе исследования использовали молотый подсолнечный жмых по ГОСТ 80–96², который является побочным продуктом переработки семян подсолнечника на масло компании ООО «ЗК Благо», и сыворотку молочную подсырную несоленую по ГОСТ 34352–2017³. Молочная сыворотка является отходом переработки молока в сыр на ООО «Фабрика Фаворит».

Жмых и сыворотку смешивали в пропорции 1:4, 1:6, 1:8 (Таблица 1).

Образец смеси заливали в стеклянную банку объемом 0,5 л, УЗ-излучатель погружали вертикально в центр банки так, чтобы торец

¹ ГОСТ 9353–2006 «Пшеница. Технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2019. — 10 с.

² ГОСТ 80–96 «Жмых подсолнечный. Технические условия». — Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2015. — 7 с.

³ ГОСТ 34352–2017 «Сыворотка молочная сырьевая. Технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2018. — 7 с.

УЗ-излучателя находился выше 0,5–1 см от ее дна. Каждый образец подвергали УЗ-облучению на установке «Ультразвуковой технологический аппарат «Волна» УЗТА-0,4/22-ОМ» (Центр ультразвуковых технологий, Бийск, Россия) (Рисунок 1) с продолжительностями 10, 20, 30 мин (Таблица 1). Банку со смесью вращали вокруг наконечника излучателя для ускорения процесса перехода смеси в суспензию.

Режим облучения для всех вариантов образцов:

- постоянные параметры: частота ультразвука — 22 кГц, мощность излучателя — 100 Вт, напряжение в сети электропитания — 220 В;
- варьируемые параметры — продолжительность облучения: 10, 20, 30 мин;
- регистрируемый зависимый параметр — температура смеси, измеряли с интервалом 10 мин, включая момент до начала обработки. В момент измерения генератор ультразвука выключали. Для определения температуры смеси использовали контактный мини-термометр стержневого типа (стик-термометр) Testo 905-T1 (Концерн Testo, Германия).

Обозначение опытных образцов и режимов УЗ-обработки представлено в Таблице 1.

Таблица 1. Обозначение опытных образцов и режимов УЗ-обработки
Table 1. Codes of the experimental samples and regimes of the ultrasound treatment

Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Продолжительность УЗ-обработки, мин	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Соотношение компонентов, ед.	1:4	1:4	1:4	1:6	1:6	1:6	1:8	1:8	1:8

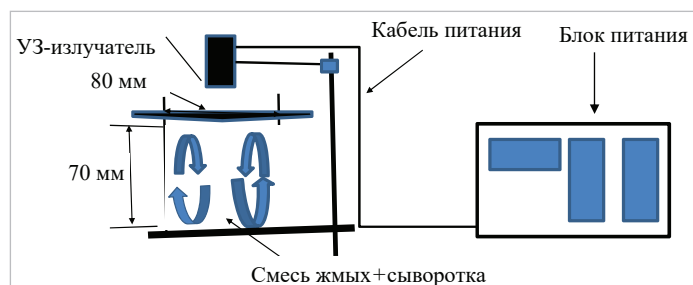


Рисунок 1. Схема установки УЗ-обработки смесей жмыха с сывороткой

Figure 1. Scheme of the plant for the ultrasound treatment of mixtures of cake with whey

Структуру жмыха и смеси изучали с помощью электронного микроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V8 с камерой Axio Cam ICc 5 (Carl Zeiss Спектроскопия GmbH, Германия) и с программным обеспечением ZEN.

Биохимический состав сырья и суспензии исследовали в лаборатории качества и безопасности отдела пищевых систем и биотехнологий СФНЦА РАН. Массовую долю белка определяли по ГОСТ Р 51417–99⁴. Массовую долю жира выявляли по ГОСТ 13979.2–94⁵. Массовую долю влаги рассчитывали по ГОСТ 13979.1–68⁶. Массовую долю клетчатки определяли по ГОСТ Р 52839–2007⁷.

Аминокислотный состав изучали с использованием прибора «Капель 105-М» № 1679 с длиной волны 254 нм («ЛЮМЭКС», Санкт-Петербург, Россия).

Микробиологические исследования проводили в лаборатории качества и безопасности отдела пищевых систем и биотехнологий СФНЦА РАН. Микробиологические показатели выявляли методами микробиологического анализа по ГОСТ 10444.12–2013⁸,

⁴ ГОСТ Р 51417–99 «Корма, комбикорма, комбинированное сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Метод Кьельдаля». — Москва: Издательство стандартов, 2002. — 7 с.

⁵ ГОСТ 13979.2–94. «Жмых, шроты и горчичный порошок. Метод определения массовой доли жира и экстрактивных веществ». — Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2015 – 7 с.

⁶ ГОСТ 13979.1–68 «Жмых, шроты и горчичный порошок. Метод определения массовой доли влаги и летучих веществ». — Москва: ИПК Издательство стандартов, 2003. — 3 с.

⁷ ГОСТ Р 52839–2007 «Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации». — Москва: Стандартинформ, 2011. — 9 с.

⁸ ГОСТ 10444.12–2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов». — Москва: Стандартинформ, 2014. — 11 с.

ГОСТ 10444.15–94⁹, ГОСТ 30726–2001¹⁰, ГОСТ 31659–2012¹¹, ГОСТ 31746–2012¹², ГОСТ 31747–2012¹³.

Экспериментальные данные исследований по изучению влияния параметров УЗ-обработки на контаминацию обрабатывали методом множественного регрессионного анализа на ПК с использованием программ Statistica 10 и Excel. При этом определяли следующие статистические характеристики: коэффициент регрессии (R), вероятность нулевых значений коэффициентов на уровне 0,05, критерий Фишера (F), уровень доверительной значимости (p) значения критерия Фишера, t-критерий Стьюдента для установления достоверности отличий между вариантами с различными соотношениями смеси.

3. Результаты и обсуждение

Химический состав вторичных сырьевых ресурсов представлен в Таблице 2. В Таблице 3 показано влияние УЗ-обработки на биохимические показатели суспензий.

Таблица 2. Химический состав вторичных сырьевых ресурсов (М±Δ)

Table 2. Chemical composition of the secondary raw material resources (M±Δ)

Наименование показателей химического состава	Подсолнечный жмых	Подсырная сыворотка
Массовая доля влаги, %	6,7±0,32*	92,8±0,30*
Массовая доля белка, %	39,2±0,68*	0,7±0,25*
Массовая доля жира, %	6,79±0,04*	0,5±0,03*
Клетчатка, %	24,24±2,91*	–
Углеводы, %	–	3,55±0,25*

Примечание: * — доверительный интервал при p<0,05.

В работах [2,19,22] представлены обзорные данные о химическом составе жмыха подсолнечника. Показано, что содержание сырого протеина может находиться в пределах от 20,15% до 61,06%, жира — от 0,5 до 15,77%, волокон — от 4,3 до 45. Такой большой диапазон значений образуется по ряду причин. Процентное содержание питательных веществ может варьироваться из-за полной или частичной очистки от оболочек маслосемян, а также от способа производства масла. Генотипические и фенотипические вариации оказывают заметное влияние на белки подсолнечника. Имеет место также ошибочная, неточная и неполная информация об исследовании в опубликованных работах.

Результаты влияния УЗ-обработки на биохимические показатели суспензий представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Химические показатели суспензий после УЗ обработки смесей, (М±m)

Table 3. Chemical indicators of the suspensions after the ultrasound treatment of the mixtures, (M±m)

N п/п	Соотношения смеси	Показатели химического состава суспензий, %			
		Влажность	Жир	Белок	Клетчатка
1	1:4	75,87±0,12	3,25±0,01	10,24±0,08	5,8±0,01
2	1:6	80,43±0,20**	2,61±0,01***	8,28±0,01**	4,9±0,01***
3	1:8	82,78±0,39**	2,31±0,04**	6,65±0,04***	4,2±0,01***

** Отличия достоверны с p<0,01 по сравнению с вариантом 1.

*** Отличия достоверны с p<0,001 по сравнению с вариантом 1.

Данные Таблицы 3 свидетельствуют о том, что наибольшие значения показателей содержания жира, белка, клетчатки наблюдаются в суспензии, полученной из смеси компонентов в соотношении 1:4. С увеличением содержания влаги в суспензии, полученной из смесей

⁹ ГОСТ 10444.15–94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов». — Москва: Стандартинформ, 2010. — 4 с.

¹⁰ ГОСТ 30726–2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида Escherichia coli». — Москва: Стандартинформ, 2010. — 6 с.

¹¹ ГОСТ 31659–2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella». — Москва: Стандартинформ, 2014. — 20 с.

¹² ГОСТ 31746–2012 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и Staphylococcus aureus». — Москва: Стандартинформ, 2013. — 22 с.

¹³ ГОСТ 31747–2012 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)». — Москва: Стандартинформ, 2013. — 13 с.

1:6 и 1:8, эти показатели уменьшаются, что объясняется уменьшением концентрации сухих веществ в единице объема суспензии. Незначительное снижение количества белка в составе компенсируется наиболее благоприятной для физиологии пищеварения жвачных животных структурой кормовой добавки, содержащей белок, жир, клетчатку [10,16,17].

О ценности корма можно судить не только по количеству белка, но и по его аминокислотному составу, играющему важнейшую роль в процессах пищеварения животного.

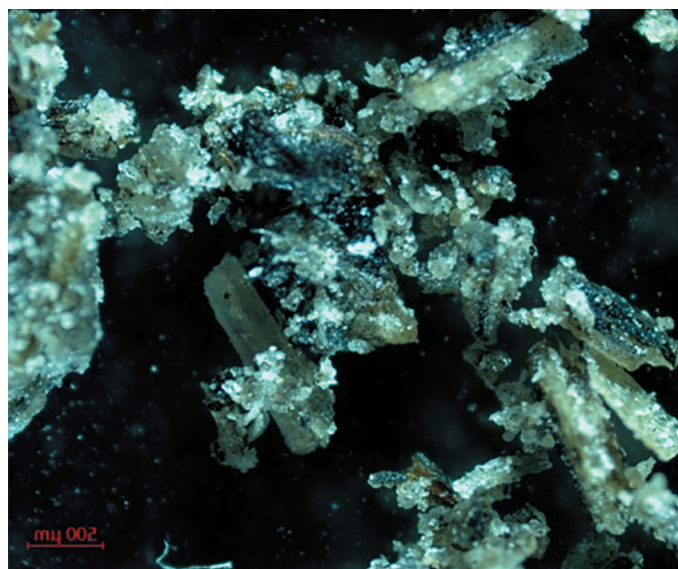
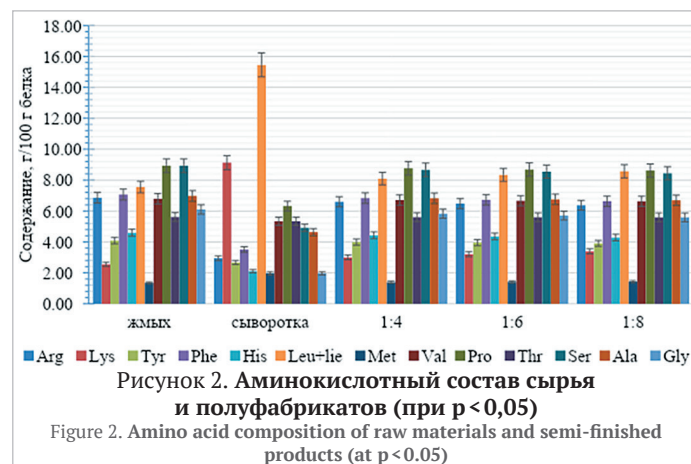
Из анализа данных следует вывод, что аминокислотный состав суспензии зависит от аминокислотного состава сырья. При меньшем содержании аминокислоты в сыворотке, чем в жмыхе, происходит снижение содержания их в суспензии и наоборот. Увеличение количества аминокислот, Lys, Leu+Ile, Met связано с их синтезом под действием аспарагиновой кислоты сыворотки. Также наблюдается незначительное снижение значений, связанное с разведением смеси.

На Рисунке 2 представлены данные по аминокислотному составу сырья и суспензий.

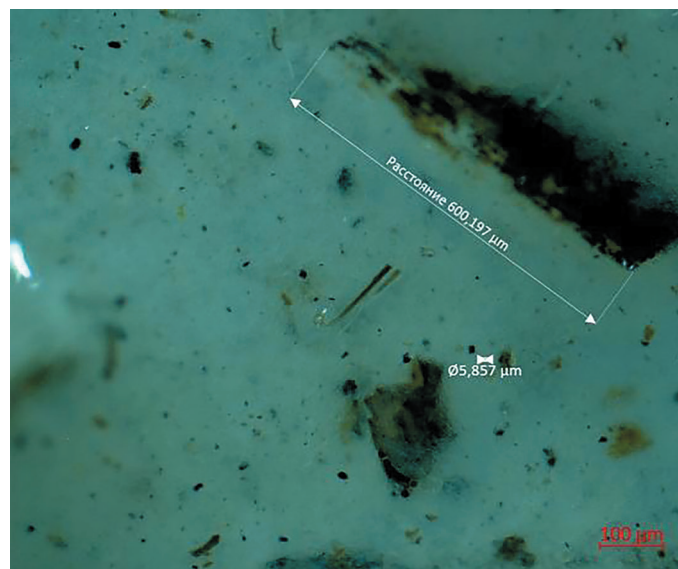
Данные, представленные на Рисунке 2, свидетельствуют о том, что УЗ-обработка не оказывает отрицательного влияния на аминокислотный состав суспензии.

Визуально было отмечено, что после УЗ-обработки смесь переходит в состояние гелеобразной суспензии. Это является результатом ударного воздействия, турбулентности, а также трения, возникающих вследствие диспергирования крупных частиц жмыха и их перемешивания с сывороткой.

На снимках микроструктуры образцов жмыха и суспензии, сделанных с помощью электронного микроскопа (Рисунки 3а, 3б, 3в, 3г), видно, что частицы жмыха существенно уменьшились с 1370,8–2776,6 мкм в сухом жмыхе до 1,8–300 мкм в суспензии. Причем подавляющее большинство частиц (60–75%) имеют размеры от 11 до 30 мкм при продолжительности УЗ-обработки 20 мин. В целом наблюдалась тенденция уменьшения размеров частиц с увеличе-



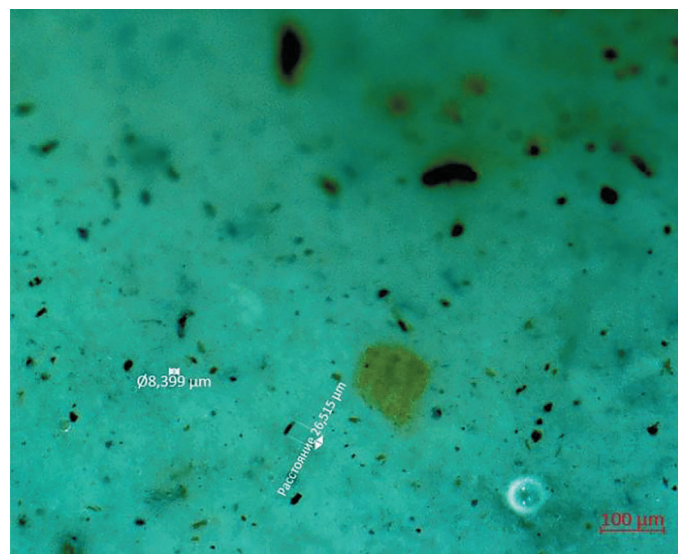
а



б



в



г

Рисунок 3. Микроструктура: а — жмыха; б — образца суспензии 1; в — образца 2; г — образца 3
Figure 3. Microstructure: a — cake; б — suspension sample 1; в — sample 2; г — sample 3

нием времени УЗ-обработки. Темные изображения на Рисунке 3 (б, в, г) — это кусочки скорлупы семени подсолнечника. Белки, жиры, клетчатка ядра семени перешли в гель суспензии. Это существенно улучшает процесс усвоения структурированных пищевых веществ жмыха при кормлении животных, что отмечено в публикациях российских и зарубежных авторов [10,15,16,17,21].

На Рисунке 4 показано процентное распределение размеров частиц жмыха в суспензии, полученной после УЗ-обработки. Из диаграммы видно, что в суспензии, образованной при соотношении компонентов смеси в зависимости от продолжительности обработки, присутствует от 10 до 34% частиц с размерами меньше 10 мкм. В основном это частицы от 11 до 30 мкм и около 5% крупных частиц с размером более 300 мкм.

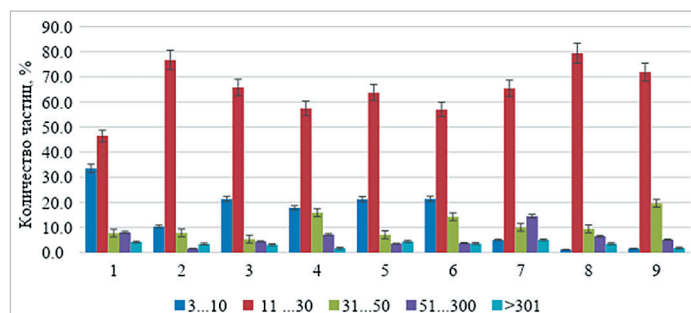


Рисунок 4. Распределение частиц в образцах 1–9 по размерам, % (при $p < 0,05$)

Figure 4. Distribution of particles in samples 1–9 by sizes, % (at $p < 0.05$)

Анализ данных Рисунка показал, что при увеличении продолжительности обработки с 10 до 20 мин происходит значительный рост доли частиц размерами от 11 до 30 мкм за счет дробления частиц размерами от 31 мкм. Также наблюдается уменьшение доли частиц размерами от 3 до 10 мкм, вероятно, из-за их измельчения до частиц размерами менее 3 мкм, которые трудно различить при использовании светового микроскопа. При увеличении времени обработки с 20 до 30 мин наблюдается уменьшение доли частиц размерами от 11 до 30 мкм и повышение доли частиц от 3 до 10 мкм, что связано с дроблением частиц размерами от 11 до 30 мкм до частиц размерами от 3 до 10 мкм.

Данные Рисунков 3 и 4 позволили сделать вывод о том, что под влиянием УЗ-обработки достигнута модификация жмыха, удовлетворяющая условию улучшения усвояемости его питательных веществ.

В результате исследований установлено, что при увеличении продолжительности УЗ-обработки от 10 до 30 минут температура смеси повышалась в пропорции 1:4 с 19,0 °C до 83,9 °C, в пропорции 1:6 с 15,0 °C до 77,0 °C и в пропорции 1:8 с 17,0 °C до 74,0 °C. Максимальная температура 83,9 °C была отмечена в образце № 3 при УЗ-обработке

в течение 30 минут в смеси с пропорцией компонентов 1:4. Более низкая температура (77,0 °C и 74,0 °C) наблюдалась в пропорции смесей 1:6 и 1:8. При соотношении 1:8 температура смеси при всех временных значениях была ниже вследствие уменьшения вязкости образующейся суспензии. При исследовании влияния температуры на компоненты смеси учитывали тот факт, что нагревание до высокой температуры понижает переваримость белков жмыха и ухудшает его вкус.

Зависимость температуры от продолжительности обработки и соотношения компонентов смеси представлена на Рисунке 5.

Анализ регрессионного уравнения (Рисунок 5) позволил сделать вывод, что на температуру смеси большое влияние оказывает фактор продолжительности УЗ-обработки. Уравнение регрессии достоверно — расчетный уровень доверительной значимости ($p = 2 \times 10^{-6}$) меньше принятого $p = 0,05$, значение критерия Фишера $F = 172,4$ ($F_f > F_t$). Коэффициент регрессии ($R = 0,99$) свидетельствует о наличии корреляции связи между зависимыми и независимыми переменными факторами.

Зависимость количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) от продолжительности УЗ-обработки и соотношения компонентов смеси представлена на Рисунке 6.

При всех соотношениях смеси с увеличением времени УЗ-обработки область меньших значений КМАФАнМ соответствует продолжительности обработки 16–30 мин. Это объясняется тем, что в условиях длительной УЗ-обработки смесь разжижается, и кавитация пузырьков и их воздействие на микроорганизмы становятся более интенсивными.

Анализ регрессионного уравнения (Рисунок 6) показал, что на содержание КМАФАнМ большое влияние оказывают оба фактора: продолжительность, соотношение компонентов в смеси и их совместное действие. Об этом свидетельствуют большие коэффициенты при «х» и «у». Уравнение регрессии достоверно — расчетный уровень доверительной значимости ($p = 0,003$) меньше принятого $p = 0,05$, значение критерия Фишера $F = 58,6$ ($F_f > F_t$). Коэффициент регрессии ($R = 0,99$) свидетельствует о наличии тесной корреляции между зависимыми и независимыми переменными факторами.

Анализ графиков на Рисунках 5 и 6 показал, что области более высоких температур (70–80 °C) соответствовали более низким значениям КМАФАнМ. Это говорит о том, что не только кавитация, но и температура, которая зависит от энергии, выделяемой при кавитации, влияла на содержание КМАФАнМ при УЗ-обработке смеси.

В Таблице 4 представлены результаты микробиологических исследований сырья и суспензии по вариантам.

Во введении уже поднимался вопрос отрицательного влияния микроорганизмов «порчи» (плесневых грибов и дрожжей) во влажной среде на качественные характеристики кормовой добавки. Установлено, что подсолнечный жмых содержит плесневые грибы $1,00 \times 10$ КОЕ в грамме продукта, дрожжи — $2,45 \times 10^3$. Сыворотка с ее значением pH 5,5 ед. способствовала созданию кислой среды смеси,

$$T, ^\circ\text{C} = 20,8333 + 3,9483 \cdot x - 0,22 \cdot y - 0,0562 \cdot x^2 - 0,037 \cdot x \cdot y - 0,0625 \cdot y^2$$

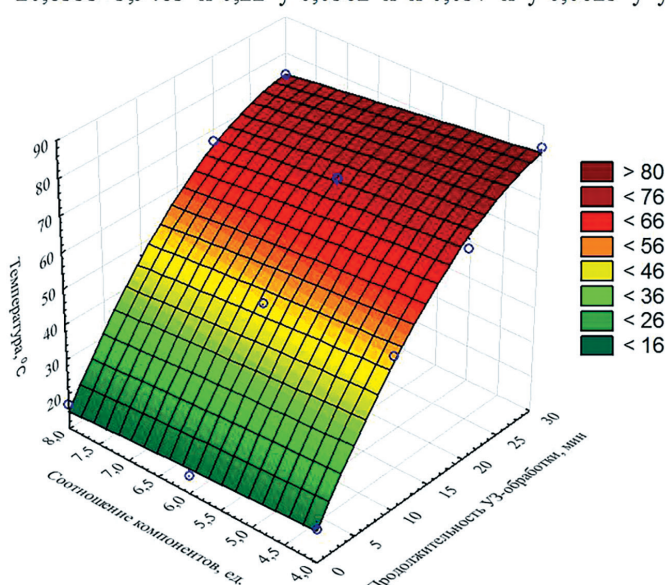


Рисунок 5. Зависимость температуры от продолжительности обработки и соотношения компонентов смеси

Figure 5. Dependence of a temperature on treatment duration and a ratio of mixture components

$$\text{КМАФАнМ}/10^5 = 89,7027 - 5,7769 \cdot x - 5,4307 \cdot y + 0,0917 \cdot x \cdot x + 0,1837 \cdot x \cdot y + 0,022 \cdot y \cdot y$$

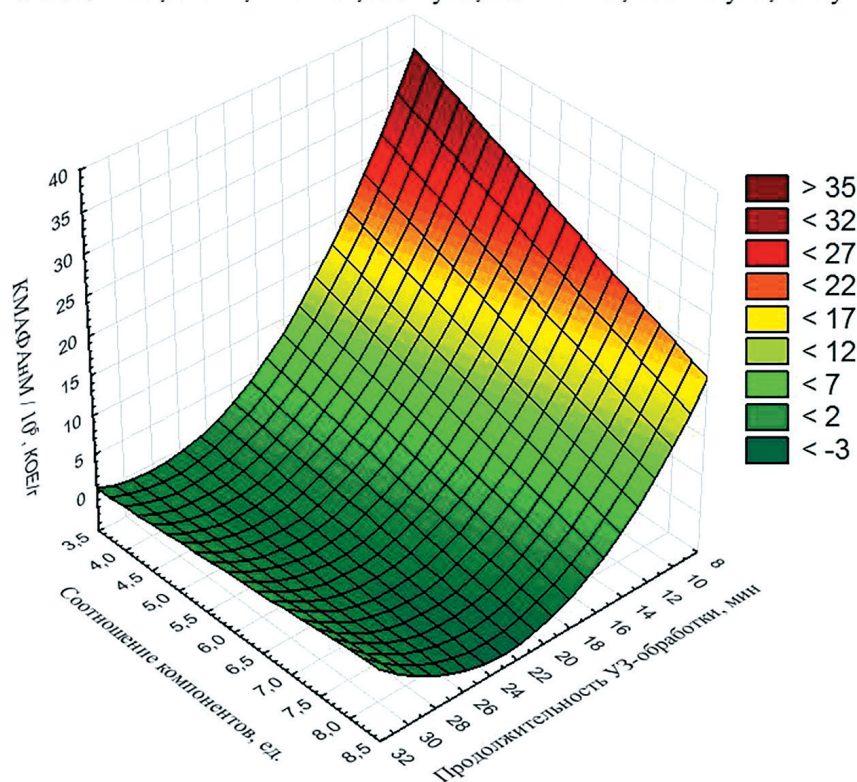


Рисунок 6. Зависимость КМАФАнМ от продолжительности УЗ-обработки и соотношения компонентов смеси
Figure 6. Dependence of QMAFAnM on ultrasound treatment duration and a ratio of mixture components

необходимой для их развития. Исследованием обнаружены в смеси плесневые грибы рода *Aspergillus*, *Mucor*, анаэробные дрожжи и актиномицеты (лучистые грибы). Известно, что некоторые аминокислоты являются питательной средой для выявленных грибов. Этим объясняется некоторое уменьшение содержания аминокислот.

Таблица 4. Результаты микробиологического анализа сырья и суспензии по вариантам

Table 4. Results of the microbiological analysis of the raw materials and suspensions by variants

Образец	КМАФАнМ, КОЕ/г	Результат						
		БГКП		<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	Плесневые грибы, КОЕ/г
		10 ¹	10 ²					Дрожжи, КОЕ/г
Жмых подсолнечный	$2,47 \times 10^5$	+	+	-	+	н/о	+	$1,00 \times 10$
Сыворотка подсырная	$9,54 \times 10^6$	+	+	-	+	н/о	н/о	н/о
1 (1:4,10 мин)	$2,79 \times 10^6$	+	+	-	+	+	+	$1,00 \times 10$
2 (1:4,20 мин)	$2,73 \times 10^5$	+	+	-	+	+	+	$2,25 \times 10^4$
3 (1:4,30 мин)	$3,00 \times 10^4$	-	-	-	-	+	+	$2,59 \times 10^2$
4 (1:6,10 мин)	$2,04 \times 10^6$	+	+	-	+	+	+	$1,00 \times 10^5$
5 (1:6,20 мин)	$6,82 \times 10^4$	-	-	-	-	+	+	$5,00 \times 10$
6 (1:6,30 мин)	$6,36 \times 10^4$	-	-	-	-	+	+	$3,60 \times 10$
7 (1:8,10 мин)	$1,29 \times 10^6$	+	+	-	+	+	+	$8,40 \times 10^5$
8 (1:8,20 мин)	$1,30 \times 10^4$	-	-	-	-	+	+	$2,04 \times 10^2$
9 (1:8,30 мин)	н/р	-	-	-	-	-	-	$1,54 \times 10$
Требования СанПиН 2.3.2.1078-01	2×10^5	0,01		В 25 г	-	0,1	0,1	50 КОЕ/г

Примечание: «+» — обнаружено, «-» — не обнаружено, «~» — сплошной рост, «н/о» — не определяли согласно требованиям НД, «н/р» — нет роста.

Анализ результатов микробиологических исследований (Таблица 4 и Рисунок 6) свидетельствует о том, что при использовании сырья, неблагополучного по микробиологическим показателям,

с увеличением времени УЗ-обработки и по мере повышения степени разведения наблюдалось снижение КМАФАнМ, а требуемый уровень безопасности был достигнут при соотношении компонентов 1:8 и при продолжительности УЗ-обработки 30 мин (режим 9). Возможно, что при применении сырья, не обсемененного *S. aureus* и *B. Cereus*, приемлемая микробиологическая чистота будет обеспечена также при режимах 3, 5, 6, 8.

Частично инактивацию микроорганизмов можно объяснить воздействием свободных радикалов, которые образуются в жидкой суспензии под действием УЗ-волн. На этот эффект инактивации микроорганизмов указывается в работе [19].

Стандартная процедура изучения микробиологической загрязненности свидетельствует о том, что различные микроорганизмы обладают неодинаковой чувствительностью к воздействию ультразвука. Бактерии более чувствительны, чем дрожжи, споровые формы бактерий более устойчивы, чем вегетативные клетки. Отсутствуют неспорообразующие бактерии БГКП, в том числе *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*. Установлено, что УЗ-обработка смеси с соотношением компонентов 1:8 более эффективна в отношении количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАиМ) кормовой добавки.

4. Выводы

- Исследованием установлено, что ультразвуковая обработка с частотой 20 кГц смеси жмыха подсолнечного и молочной сыворотки приводит к распаду крупных частиц жмыха размером 1370,8–2776,6 мкм на мелкие размером до 1,8–300 мкм в суспензии. Причем подавляющее большинство частиц (60–75%) имеют размеры от 11 до 30 мкм при продолжительности УЗ-обработки 20 мин. При этом образуется гомогенная гелеобразная масса, содержащая питательные вещества в более доступной форме.
- Установлено, что под действием кавитации при УЗ-обработке и за счет воздействия температуры от 74,0 до 83,9 °C численность всех представителей микробиоты кормовой смеси снижалась до уровня безопасного для животного.
- Для определения эффективности рассматриваемого способа подготовки кормовой добавки необходимо провести кормление животных в хозяйствах в достаточных объемах.
- Проведенные исследования представляют интерес в научно-практическом плане для трансфера технологий с целью получения нового продукта.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Мотовилов, К. Я., Булатов, А. П., Позняковский, В. М., Ланцева, Н. Н. (2010). Экспертиза кормов и кормовых добавок. Глава в книге: Корма и кормовые добавки для сельскохозяйственных животных. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010.
- Subaşı, B. G., Vahapoğlu, B., Capanoglu, E., Mohammadifar, M. A. (2022). A review on protein extracts from sunflower cake: Techno-functional properties and promising modification methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(24), 6682–6697. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1904821>
- Zubiria, I., Garcia-Rodriguez, A., Atxaerandio, R., Ruiz, R., Benhissi, H., Mandaluniz, N. et al. (2019). Effect of feeding cold-pressed sunflower cake on Ruminal fermentation, lipid metabolism and bacterial community in dairy cows. *Animals*, 9(10), Article 755. <https://doi.org/10.3390/ani9100755>
- Souza, D. H., Freitas, E. R., Alencar, A. V. O., Costa, M. K. O., Santos, A. S., Freire J. F. et al. (2020). Sunflower cake in brown-egg laying pullet diets: Effects on the growing phase and on the beginning of production cycle. *Animal Feed Science and Technology*, 269, Article 114663. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114663>
- Petraru, A., Ursachi, F., Amariei, S. (2021). Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake. Perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient. *Plants*, 10(11), Article 2487. <https://doi.org/10.3390/plants10112487>
- Zardo, I., de Espíndola Sobczyk, A., Marczyk, L. D. F., Sarkis, J. (2019). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from sunflower seed cake using response surface methodology. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 33–44. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0038-3>
- Neves, G. N., Alonso, E. (2021). Valorization of sunflower by-product using microwave-assisted extraction to obtain a rich protein flour: Recovery of chlorogenic acid, phenolic content and antioxidant capacity. *Food and Bioprocess Technology*, 125, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.008>
- Oliveira, V. da S., Oliveira, R. L., Goes, R. H. T. B., Silva, T. M., Silva, L. F., Freitas, L. S. et al. (2019). Physicochemical composition, fatty acid profile and sensory attributes of the meat of young Nellore bulls fed sunflower cake from the biodiesel industry. *Livestock Science*, 227, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.07.012>
- Sert, D., Rohm, H., Struck, S. (2022). Ultrasound-assisted extraction of protein from pumpkin seed press cake: Impact on protein yield and techno-functionality. *Foods*, 11(24), Article 4029. <https://doi.org/10.3390/foods11244029>
- Байков, А. С. (2021). Использование зернового сырья и продуктов его переработки, подвергнутых кавитационному воздействию, в рационе молодняка крупного рогатого скота. Автореф. дис. канд. техн. наук. Оренбург: Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий. — 25 с.
- Байков, А. С., Рахимжанова, И. А., Ширнина, Н. М., Галиев, Б. Х. (2017). Влияние ультразвуковой кавитационной обработки на химический состав кормов, используемых при кормлении жвачных животных. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*, 6(68), 180–184.
- Мирошников, С. А., Муслимова, Д. М., Быков, А. В., Рахматуллин, Ш. Г., Быкова, Л. А. (2012). Новые подходы к созданию кормовых продуктов на основе поликомпонентных растительно — минеральных смесей, подвергнутых кавитационной обработке. *Вестник мясного скотоводства*, 3(77), 7–11.
- Ashokkumar, M., Rink, R., Shestakov, S. D. (2011). Hydrodynamic cavitation — an alternative to ultrasonic food processing. *Technical Acoustics*, 11, Article 9.
- Прокопов, А. Ю. (2005). Научные основы производства продуктов питания: Учебное пособие. Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2005.
- Goes, R. H. de T. e B. de, Silva, L. H. X. da, Díaz, T. G., Branco, A. F., Teodoro, A. L., Ferreira, G. R. (2019). Sunflower cake in diets for beef cattle: Digestibility, kinetics and in vitro ruminal fermentation parameters. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 41(1), Article e39492. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v41i1.39492>
- Ширнина, Н. М., Галиев, Б. Х., Картеенов, К. Ш., Мирошников, И. С., Балмугамбетова, А. Ж., Рябов, Н. И. (2017). Влияние кавитационного воздействия на химический состав и переваримость сухого вещества грубых кормов используемых в животноводстве. *Вестник мясного скотоводства*, 3(99), 134–139
- Мирошников, И. С., Холодилина, Т. Н., Дускаев, Г. К., Васильченко, А. С. (2016). Физико-химические свойства и переваримость кормовых добавок, подвергнутых кавитационной обработке. *Вестник мясного скотоводства*, 4(96), 131–135.
- Grasso, S., Omoarukhe, E., Wen, X., Papoutsis, K., Methven, L. (2019). The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. *Foods*, 8(8), Article 305. <https://doi.org/10.3390/foods8080305>
- Sonawane, S. K., Ambadgatti, S., Patil, S., Dabade, A., Arya, S. S., Bhushette, P. (2020). A review on recent trends of ultrasound assisted processing in food segment. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(1), 1–4. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.1.1-4>
- Shah, N. P., Patel, A. R. (2019). Prospective utilization of valuable dairy by-product: Whey. *Annals. Food Science and Technology*, 20(2), 260–267.
- Плотникова, И. В., Шенцова, Е. С., Полянский, К. К., Писаревский, Д. С. (2020). Химический состав и технологические свойства различных видов молочной сыворотки. Сыроделие и маслоделие, 3, 43–45. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-3-43-45>
- Arrutia, F., Binner, E., Williams, P., Waldron, K. W. (2020). Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science and Technology*, 100, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.044>

REFERENCES

- Motovilov, K. Ya., Bulatov, A. P., Poznyakovsky, V. M., Lantseva, N. N. (2010). Examination of feed and feed additives. Chapter in the book: Feed and feed additives for farm animals. Novosibirsk: Siberian University publishing house, 2010. (In Russian)
- Subaşı, B. G., Vahapoğlu, B., Capanoglu, E., Mohammadifar, M. A. (2022). A review on protein extracts from sunflower cake: Techno-functional properties and promising modification methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(24), 6682–6697. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1904821>
- Zubiria, I., Garcia-Rodriguez, A., Atxaerandio, R., Ruiz, R., Benhissi, H., Mandaluniz, N. et al. (2019). Effect of feeding cold-pressed sunflower cake on Ruminal fermentation, lipid metabolism and bacterial community in dairy cows. *Animals*, 9(10), Article 755. <https://doi.org/10.3390/ani9100755>
- Souza, D. H., Freitas, E. R., Alencar, A. V. O., Costa, M. K. O., Santos, A. S., Freire, J. F. et al. (2020). Sunflower cake in brown-egg laying pullet diets: Effects on the growing phase and on the beginning of production cycle. *Animal Feed Science and Technology*, 269, Article 114663. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114663>
- Petraru, A., Ursachi, F., Amariei, S. (2021). Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake. Perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient. *Plants*, 10(11), Article 2487. <https://doi.org/10.3390/plants10112487>
- Zardo, I., de Espíndola Sobczyk, A., Marczyk, L. D. F., Sarkis, J. (2019) Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from sunflower seed cake using response surface methodology. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 33–44. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0038-3>
- Neves, G. N., Alonso, E. (2021). Valorization of sunflower by-product using microwave-assisted extraction to obtain a rich protein flour: Recovery of chlorogenic acid, phenolic content and antioxidant capacity. *Food and Bioprocess Technology*, 125, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.008>
- Oliveira, V. da S., Oliveira, R. L., Goes, R. H. T. B., Silva, T. M., Silva, L. F., Freitas, L. S. et al. (2019). Physicochemical composition, fatty acid profile and sensory attributes of the meat of young Nellore bulls fed sunflower cake from the biodiesel industry. *Livestock Science*, 227, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.07.012>
- Sert, D., Rohm, H., Struck, S. (2022). Ultrasound-assisted extraction of protein from pumpkin seed press cake: Impact on protein yield and techno-functionality. *Foods*, 11(24), Article 4029. <https://doi.org/10.3390/foods11244029>
- Baykov, A. S. (2021). The use of grain raw materials and products of its processing subjected to cavitation in the diet of young cattle. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Technical Sciences. Orenburg, Federal Research Center of Biological Systems and Agrotechnologies. — 25 p. (In Russian)
- Baykov, A. S., Rakhimzhanova, I. A., Shirnina, N. M., Galiev, B. H. (2017). Influence of ultrasound cavitation treatment on chemical composition of feeds used in feeding of ruminants. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*, 6(68), 180–184. (In Russian)
- Miroshnikov, S. A., Muslyumova, D. M., Bykov, A. V., Rakhmatullin, Sh. G., Bykova, L. A. (2012). New approaches to the creation of feed products based on multicomponent plant-mineral mixtures subjected to cavitation treatment. *Bulletin of Beef Cattle Breeding*, 3(77), 7–11. (In Russian)
- Ashokkumar, M., Rink, R., Shestakov, S. D. (2011). Hydrodynamic cavitation — an alternative to ultrasonic food processing. *Technical Acoustics*, 11, Article 9.
- Prosekov, A. Yu. (2005). Scientific foundations of food production. Kemerovo: Kemerovo Technological Institute of Food Industry, 2005. (In Russian)
- Goes, R. H. de T. e B. de, Silva, L. H. X. da, Díaz, T. G., Branco, A. F., Teodoro, A. L., Ferreira, G. R. (2019). Sunflower cake in diets for beef cattle: Digestibility, kinetics and in vitro ruminal fermentation parameters. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 41(1), Article e39492. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v41i1.39492>
- Shirnina, N. M., Galiyev, B. K., Kartekenov, K. S., Miroshnikov, I. S., Balmugambetova, A. Z., Ryabov, N. I. (2017). Effect of cavitation on chemical composition and digestibility of dry matter of coarse forage used in animal husbandry. *Bulletin of Beef Cattle Breeding*, 3(99), 134–139. (In Russian)
- Miroshnikov, I. S., Kholodilina, T. N., Duskaev, G. K., Vasilchenko, A. S. (2016). Physico-chemical properties and digestibility of feed additives, subjected to the cavitation. *Bulletin of Beef cattle Breeding*, 4(96), 131–135. (In Russian)
- Grasso, S., Omoarukhe, E., Wen, X., Papoutsis, K., Methven, L. (2019). The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. *Foods*, 8(8), Article 305. <https://doi.org/10.3390/foods8080305>
- Sonawane, S. K., Ambadgatti, S., Patil, S., Dabade, A., Arya, S., Bhushette, P. (2020). A review on recent trends of ultrasound assisted processing in food segment. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(1), 1–4. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.1.1-4>
- Shah, N. P., Patel, A. R. (2019). Prospective utilization of valuable dairy by-product: Whey. *Annals. Food Science and Technology*, 20(2), 260–267.
- Plotnikova, I. V., Shentsova, E. S., Polyanskiy, K. K., Pisarevskiy, D. S. (2020). Chemical composition and technological properties different types of whey. *Cheesemaking and Buttermaking*, 3, 43–45. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-3-43-45>
- Arrutia, F., Binner, E., Williams, P., Waldron, K. W. (2020). Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science and Technology*, 100, 88–102. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.044>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Волончук Сергей Константинович — кандидат технических наук, научный сотрудник, отдел пищевых систем и биотехнологий, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук 630501, Новосибирская обл., р. п. Краснообск, а/я 463 Тел.: +7-913-781-90-94 E-mail: volonchuk2015@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6697-8736 * автор для контактов	Sergey K. Volonchuk, Candidate of Technical Sciences, Researcher, Department of Food Systems and Biotechnologies, Siberian Federal Research Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences Box 463, Novosibirsk region, 630501, Krasnoobsk, Russia Tel.: +7-913-781-90-94 E-mail: volonchuk2015@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6697-8736 * corresponding author
Мазалевский Виктор Борисович — кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник, отдел пищевых систем и биотехнологий, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук 630501, Новосибирская обл., р. п. Краснообск, а/я 463 Тел.: +7-999-464-35-36 E-mail: mazalevskij@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5870-2350	Viktor B. Mazalevskiy, Candidate of Technical Sciences, Docent, Senior Researcher, Department of Food Systems and Biotechnologies, Siberian Federal Research Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences Box 463, Novosibirsk region, 630501, Krasnoobsk, Russia Tel.: +7-999-464-35-36 E-mail: mazalevskij@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5870-2350
Станкевич Светлана Владимировна — кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник, отдел пищевых систем и биотехнологий, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук 630501, Новосибирская обл., р. п. Краснообск, а/я 463 Тел.: +7-913-765-31-15 E-mail: sveticstank@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5157-2004	Svetlana V. Stankevich, Candidate of Agricultural Sciences, Researcher, Department of Food Systems and Biotechnology, Siberian Federal Research Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences Box 463, Novosibirsk region, 630501, Krasnoobsk, Russia Tel.: +7-913-765-31-15 E-mail: sveticstank@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5157-2004
Чекрыга Галина Петровна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, отдел пищевых систем и биотехнологий, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук 630501, Новосибирская обл., р. п. Краснообск, а/я 463 Тел.: +7-913-394-14-42 E-mail: niip56@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3756-79	Galina P. Chekryga, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Food Systems and Biotechnology, Siberian Federal Research Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences Box 463, Novosibirsk region, 630501, Krasnoobsk, Russia Tel.: +7-913-394-14-42 E-mail: niip56@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3756-79
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-457-462>

Поступила 26.05.2023

Поступила после рецензирования 16.10.2023

Принята в печать 24.10.2023

© Витол И. С., Мелешкина Е. П., Крикунова Л. Н., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

КОМПОЗИЦИИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ПОЛИКОМПОНЕНТНЫХ ОТРУБЕЙ

Витол И. С.^{1*}, Мелешкина Е. П.¹, Крикунова Л. Н.²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт зерна и продуктов его переработки, Москва, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

пшеница, чечевица, лен, отруби, мультэнзимные композиции, биокатализ

Микробные ферментные препараты (ФП) целлюлолитического, протеолитического, фитазного действия и их композиции при действии на зерновые отруби позволяют с помощью направленного биокатализа получать достаточно широкий спектр продуктов гидролиза белков, некрахмальных полисахаридов и фитина. Использование ФП и мультэнзимных композиций (МЭК) является по своей сути современным инструментарием интенсификации биохимических процессов, лежащих в основе той или иной пищевой технологии. Наряду с этим ФП позволяют модифицировать продукты переработки растительного сырья, в частности зерновых, бобовых и масличных культур (глубокая переработка), и получать ценные кормовые и пищевые ингредиенты. Разработаны и научно обоснованы две мультэнзимные композиции на основе отечественных и зарубежных ФП. Определены оптимальные условия для проведения ферментативных реакций при использовании в качестве субстрата пшенично-чечевиочно-льняных отрубей. Показана высокая эффективность разработанных МЭК: доля РВ в исследуемых гидролизатах увеличивалась по сравнению с массовой долей автолизатов пшеничных и трехкомпонентных отрубей в 2,8 и 2,3 раза (МЭК-1) и в 3,5 и 2,7 раза (МЭК-2) соответственно. Содержание растворимого белка возросло в 4,7 и 3,0 раза (МЭК-1) и в 6,4 и 4,2 раза (МЭК-2). Доля растворимого фосфора увеличивалась в среднем в 3,0–3,5 раза при использовании МЭК-1 и МЭК-2. Методом гель-хроматографии было установлено, что фракция, содержащая низкомолекулярные пептиды и свободные аминокислоты (М.м. <1000 Да) в гидролизатах, полученных с использованием МЭК, в 3–4 раза превосходит аналогичную фракцию в гидролизатах под действием собственных эндогенных ферментов (автолиз). При этом, по результатам ВЭЖХ, концентрация наиболее ценных аминокислот с точки зрения азотного питания дрожжей (аспарагиновой кислоты, аргинина) в опытных гидролизатах трехкомпонентных отрубей повышалась в среднем в 2,5–3,0 раза; концентрация валина — в 5 раз; гистидина и изолейцина — в 2,0–2,5 раза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FGUS-2022–0006 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук при поддержке гранта форме субсидии № 075–15–2022–035 от 22.02.2022.

Received 26.05.2023

Accepted in revised 16.10.2023

Accepted for publication 24.10.2023

© Vitol I. S., Meleshkina E. P., Krikunova L. N., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

COMPOSITIONS OF ENZYME PREPARATIONS FOR TARGETED MODIFICATION OF MULTICOMPONENT BRAN

Irina S. Vitol^{1*}, Elena P. Meleshkina¹, Lyudmila N. Krikunova²

¹ All-Russian Scientific and Research Institute for Grain and Products of its Processing, Moscow, Russia

² All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry, Moscow, Russia

KEY WORDS:

wheat, lentil, flax, bran, multienzyme preparations, biocatalysis

ABSTRACT

Microbial enzyme preparations (EPs) of the cellulolytic, proteolytic and phytase action, as well as their compositions, allow obtaining quite a wide spectrum of products of hydrolysis of proteins, non-starch polysaccharides and phytin by means of targeted biocatalysis upon action on grain bran. The use of EPs and multienzyme compositions (MECs) is inherently a modern tool for intensification of biochemical processes underlying one or another food technology. At the same time, EPs allow modifying products of processing plant raw materials, in particular cereal, leguminous and oil-bearing crops (deep processing) and obtain valuable feed and food ingredients. Two multienzyme compositions based on domestic and foreign EPs have been developed and scientifically substantiated. Optimal conditions have been determined for conducting enzymatic reactions when using wheat-lentil-flax bran as a substrate. High effectiveness of the developed MECs has been shown: the proportion of reducing substances (RS) in the hydrolysates under study increased compared to the mass fraction of the autolysates of wheat and three-component bran by 2.8 and 2.3 times (MEC-1) and by 3.5 and 2.7 times (MEC-2), respectively. The content of soluble protein increased by 4.7 and 3.0 times (MEC-1) and by 6.4 and 4.2 times (MEC-2). The proportion of soluble phosphorus increased on average by 3.0–3.5 times when using MEC-1 and MEC-2. It has been found by gel-electrophoresis that the fractions containing low-molecular-weight peptides and free amino acids (MW <1000 Da) in the hydrolysates obtained using MECs exceeded by 3–4 times the corresponding fraction in the hydrolysates obtained under the action of endogenous enzymes (autolysis). With that, according to the HPLC results, the concentration of amino acids that are most valuable in terms of nitrogenous nutrition of yeasts (aspartic acid, arginine) increased on average by 2.5–3.0 times, the concentration of valine by 5 times, histidine and isoleucine by 2.0–2.5 times in the experimental hydrolysates of three-component bran.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FGUS-2022–0006 of the state assignment of the V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS; with the support of a grant in the form of a subsidy No. 075–15–2022–035 dated 22.02.2022.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Витол, И. С., Мелешкина, Е. П., Крикунова Л. Н. (2023). Композиции ферментных препаратов для направленной модификации поликомпонентных отрубей. *Пищевые системы*, 6(4), 457–462. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-457-462>

FOR CITATION: Vitol, I. S., Meleshkina, E. P., Krikunova L. N. (2023). Compositions of enzyme preparations for targeted modification of multicomponent bran. *Food Systems*, 6(4), 457–462. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-457-462>

1. Введение

Использование ферментных препаратов (ФП) для решения различных технологических задач в пищевой промышленности в настоящее время является достаточно распространенным приемом [1,2,3]. Целью применения ФП в производстве продуктов питания, как известно, является интенсификация биохимических процессов, лежащих в основе той или иной пищевой технологии, а также увеличение выхода продукта, улучшение его качественных характеристик, например, при получении концентрированного зернового сусла для спиртового производства [4], активации дрожжей с целью интенсификации спиртового брожения и увеличении выхода конечного продукта [5,6].

В настоящее время интерес исследователей к ФП лежит еще в одной плоскости, а именно в использовании ФП как инструментария для глубокой переработки растительного сырья, в частности зерновых, бобовых и масличных культур и получения ингредиентов, которые позволяют увеличить биологическую ценность продуктов, предназначенных для кормовых и пищевых целей [7,8,9]. Ферментативный способ модификации предпочтительнее физико-химической модификации, поскольку его преимуществами являются мягкие режимы проведения реакций, возможность регулирования степени гидролиза, определенная направленность и сохранение биологической ценности [10,11,12]. В результате модификации биополимеров (белков, некрахмальных полисахаридов) с использованием ферментных препаратов с различной специфичностью действия могут быть получены продукты, обладающие определенными свойствами [11,12,13].

Во ВНИИ зерна и продуктов его переработки активно изучается возможность использования ФП целлюлолитического и протеолитического действия, а также их композиций для ферментативной модификации биополимеров побочных (вторичных) продуктов мукомольного и крупяного производства (зерновых отрубей, продуктов шелушения, обрушения, шлифования) [11,14]. Цель — получение гидролизатов и структурно-модифицированных отрубей, обладающих определенными свойствами, что в итоге позволит использовать их не только в качестве обогатителей для повышения пищевой и биологической ценности продуктов питания, но и для придания им новых функциональных и функционально-технологических свойств. Это позволит создавать новые виды продуктов на зерновой основе для массового потребления, а также специализированные виды продуктов для лечебно-профилактического питания [15,16,17].

Еще одним аспектом применения ферментативных гидролизатов зерновых отрубей, является их использование для обеспечения сбалансированного азотистого и фосфорного питания дрожжей рода *Saccharomyces* в технологиях брожения. Ферментативный гидролиз белков и фитина позволяет обеспечить переход в растворимые формы фосфора и белковых веществ (в том числе и свободных аминокислот), что в конечном счете положительно сказывается на их усвоении дрожжами [18,19,20]. В этом случае наряду с указанными выше ферментными препаратами необходимо применять препараты фитазы [4,21], расщепляющие фитин (инозитолгексафосфорная кислота), который содержится в периферийной части зерновки и переходит в отруби при переработке зерна на мукомольных предприятиях.

Таким образом, микробные ферментные препараты были и остаются важным биотехнологическим инструментарием совершенствования пищевых технологий, способных воздействовать на биохимические и микробиологические процессы, лежащие в основе подавляющего большинства пищевых технологий [1,2,22,23].

Цель исследования — разработка композиций микробных ферментных препаратов отечественного и зарубежного производства для направленной модификации поликомпонентных отрубей.

2. Материалы и методы

Объектом исследования служили отечественные и импортные ферментные препараты (ФП) с различной специфичностью действия (Таблица 1). В качестве природного субстрата использовали поликомпонентные отруби, полученные путем совместного лабораторного помола трехкомпонентной зерновой смеси, состоящей из 85% зерна пшеницы, 10% семян чечевицы и 5% семян льна.

Эффективность действия ферментного препарата целлюлолитического действия оценивали по накоплению редуцирующих веществ, ферментных препаратов протеолитического действия — по накоплению растворимого белка, а эффективность ферментного препарата фитазы оценивали по накоплению ионов PO_4^{3-} , образовавшихся в результате реакции гидролиза фитина. Определение содержания ионов PO_4^{3-} проводили колориметрическим методом при длине вол-

ны 670 нм на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) с использованием градуировочной кривой (ГОСТ 31487–2012¹).

Таблица 1. Характеристика ФП на стандартных субстратах
Table 1. Characterization of EPs on standard substrates

Ферментный препарат	Производитель	Стандартная активность	Оптимум pH	Оптимум T, °C
целлюлолитический ферментный препарат				
«Агроксил Премиум»	ОАО «Агрофермент», Россия	3000 ед. КМЦА 4000 ед. КсА 2500 ед. β-КсА	5,0	50
фитаза				
«Агрофит»	ОАО «Агрофермент», Россия	5000 ед. ФА	5,0	40
протеолитические ферментные препараты				
«Пенициллопепсин» + «Оризин» 1:1	ОАО «Агрофермент», Россия	сериновая протеиназа 6500 ед. ПС кислая протеиназа 300 ед. ПС	10,5	40
			4,7	30
«Нейтраза 0,8L»	«Новозаймс», Дания	800 ед. ПС	5,5–7,5	45–55

Основные кинетические параметры ферментативных реакций с использованием ФП разной специфичности при их действии на отруби определяли при следующих условиях: начальную скорость ферментативной реакции — графическим методом. Начальная скорость ферментативной реакции (V_0) — это скорость в начальный момент времени, когда реакция идет по 0-порядку, то есть наблюдается прямая пропорциональная зависимость между временем действия фермента и продуктами реакции. V_0 является мерой количества фермента. На практике для ее определения экспериментально строят кривую хода ферментативной реакции во времени (для этого через определенные интервалы времени из инкубационной смеси отбирают пробы, в которых выявляют продукты реакции) и рассчитывают время, соответствующее прямолинейному участку на графике (реакция 0-порядка). Температурные оптимумы действия ферментных препаратов изучали в диапазоне от 20 до 70 °C, оптимумы pH — от 3,0 до 8,5 с использованием 0,1 М цитратно-фосфатного и фосфатного буферов. Для выявления оптимальной дозировки ФП применяли диапазон конечных концентраций в инкубационной смеси от 0,25 до 1,25 ед./г отрубей, насыщающую концентрацию субстрата — в диапазоне от 20 до 120 мг/мл.

Общее содержание белка определяли по методу Кьельдаля ($N \times 6,25$), количество растворимого белка — по методу Лоури, содержание редуцирующих веществ (восстанавливающих сахаров) — по методу Бертрана [24], зольность — с сжиганием муки с последующим расчетом массы несгораемого остатка (ГОСТ 27494–2016²). Влажность определяли по ГОСТ 9404–88³. Выявление массовой доли фосфора в образцах отрубей проводили в соответствии с ГОСТ 30615–99⁴. Метод заключается в сухой минерализации пробы, растворении золы, проведении цветной реакции с молибден-ванадиевым реактивом и измерении интенсивности желтого окрашивания раствора при длине волны 440 нм в кюветах с рабочей длиной 10 мм на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Разделение продуктов протеолиза проводили методом гель-хроматографии [24] на колонке (2,3×35) с TSK-gel Toyopearl HW-55F (ToSoH bioSep, Япония). Параметры колонки: свободный объем — 44 мл (по выходу декстрана синего с молекулярной массой около 2 млн Да); общий объем — 140 мл (по выходу тирозина). На колонку наносили 5 мл исследуемого раствора. Элюцию проводили дистиллированной водой. Объем собираемых фракций — 4 мл. Регистрацию оптической плотности элюата во фракциях осуществляли при длине волны 280 нм на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

¹ ГОСТ 31487–2012 «Ферментные препараты. Методы определения ферментативной активности фитазы». М.: Стандартинформ, 2012. — 12 с.

² ГОСТ 27494–2016 «Мука и отруби. Методы определения зольности». М.: Стандартинформ, 2019. — 15 с.

³ ГОСТ 9404–88 «Мука и отруби. Метод определения влажности». М.: Стандартинформ, 2007. — 4 с.

⁴ ГОСТ 30615–99 «Сырье и продукты пищевые. Метод определения фосфора». Минск: 2019. — 6 с.

Разделение аминокислот проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent Technologies 1200 Series (Agilent, США) с хроматографической колонкой Luna 5u C18(2) 150×4,6 мм 5 μ (Phenomenex, США) с предколонкой в соответствии с ГОСТ 34230–2017⁵. Применяли следующие рабочие параметры жидкостного хроматографа: скорость потока элюента (ацетонитрил/ацетатный буферный раствор) — 1,0 см³/мин; градиент, %: 0–28 мин — 10/90; 29–40 мин — 28/72; 41–50 мин — 25/75; 51–55 мин — 50/50; 56–60 мин — 90/10; 61–60 мин — 10/90.

Для обработки результатов исследований, в ходе которой из 3–5 измерений для каждого образца определяли средние значения величин, среднеквадратичное отклонение и доверительный интервал, использовались методы математической статистики с применением программного обеспечения Microsoft Excel (версия Excel 19.0, выпуск 2018 г., Microsoft, США) [25].

3. Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований были изучены основные кинетические характеристики используемых ФП при действии на трехкомпонентные отруби. На Рисунках 1 и 2 в качестве примера представлены данные по влиянию температуры и pH на активность ФП разной специфичности действия.

Обобщенные данные по кинетике ферментативных реакций (начальная скорость реакции (V_0), оптимальные температура и pH, оптимальное количество ФП) с использованием исследуемых ферментных препаратов отражены в Таблице 2.

Таблица 2. Сводная таблица основных кинетических параметров при действии на трехкомпонентные отруби (пшенично-чечевично-льняные)

Table 2. Summary table of the main kinetic parameters upon action on three-component bran (wheat-lentil-flax)

Показатель	«Агроксил Премиум»	«Агрофит»	«Пенициллопепсин + Оризин»	«Нейтраза 0,8L»
V_0 , мин	30	30	30	30
Оптимум T , °C	40–50	40	40	40–50
Оптимум pH	4,5–5,0	5,0	5,0	5,0–6,0
Оптимальная дозировка ФП	1,2 ед. ЦА/г отрубей	0,5 ед. ФА/г отрубей	0,8 ед. ПС/г отрубей	0,5 ед. ПС/г отрубей

На втором этапе исследований была изучена эффективность ФП при действии на биополимеры трехкомпонентных (пшенично-чечевично-льняные) отрубей (Рисунок 3).

На заключительном этапе исследования были разработаны две мультэнзимные композиции, включающие ферментные препараты целлюлолитического, протеолитического действия и фитазы: МЭК-1 («Агроксил Премиум» + «Агрофит» + «Пенициллопепсин + Оризин»; МЭК-2 («Агроксил Премиум» + «Агрофит» + «Нейтраза 0,8L»).

При их разработке в качестве научного обоснования использовали следующие критерии:

- в состав МЭК должны входить ФП разной специфичности действия, имеющие близкие по значению оптимумы pH и температуры;
- ФП в составе МЭК должны иметь высокую эффективность действия на природный субстрат; в данном случае — активно гидролизовать соответствующие субстраты поликомпонентных отрубей (белки, некрахмальные полисахариды, фитин);
- возможность синергетического эффекта при действии ФП разной специфичности (в данном случае ФП целлюлолитического и протеолитического действия);
- учет аутолитических процессов под действием собственных (эндогенных) ферментных систем, в первую очередь кислой протеиназы, а также фитазы зерна, которые сосредоточены в периферийных частях зерновки и переходят в отруби при переработке зерна [15,16].

Учитывая вышеизложенное, проведение ферментативных реакций осуществляли при оптимальных условиях согласно следующим вариантам:

Контроль 1: пшеничные отруби: вода (гидро модуль 1:10), гидролиз под действием собственных ферментов при pH 4,5 в течение 4-х часов при температуре 40 °C;

Контроль 1–1: пшенично-чечевично-льняные отруби: вода (гидро модуль 1:10), гидролиз под действием собственных

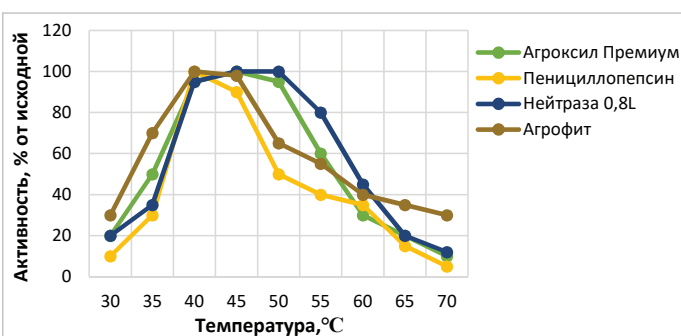


Рисунок 1. Влияние температуры на активность ферментных препаратов при действии на трехкомпонентные отруби

Figure 1. Effect of temperature on the activity of enzyme preparations upon action on three-component bran

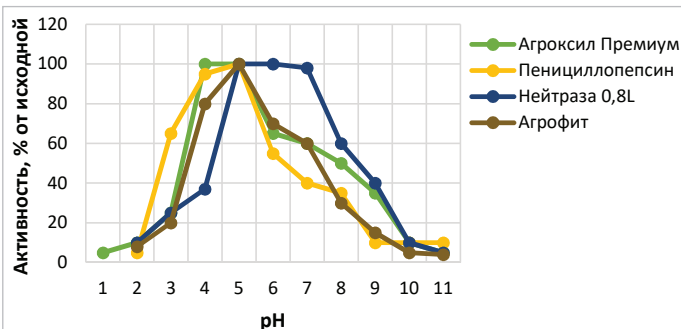


Рисунок 2. Влияние pH на активность ферментных препаратов при действии на трехкомпонентные отруби

Figure 2. Influence of pH on the activity of enzyme preparations upon action on three-component bran

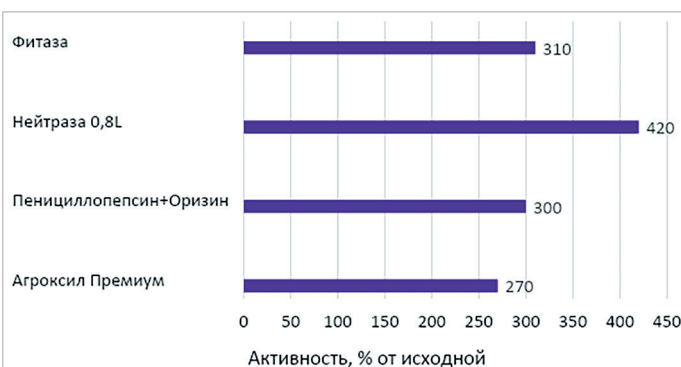


Рисунок 3. Эффективность ферментных препаратов при действии на пшенично-чечевично-льняные отруби

Figure 3. Effectiveness of enzyme preparations upon action on wheat-lentil-flax bran

ферментов при pH 4,5 в течение 4-х часов при температуре 40 °C;

Контроль 2: пшеничные отруби: вода (гидро модуль 1:10), гидролиз под действием собственных ферментов при pH 5,5 в течение 4-х часов при температуре 50 °C;

Контроль 2–1: пшенично-чечевично-льняные отруби: вода (гидро модуль 1:10), гидролиз под действием собственных ферментов при pH 5,5 в течение 4-х часов при температуре 50 °C;

Опыт 1: пшенично-чечевично-льняные отруби (гидро модуль 1:10) + МЭК-1, температура 40 °C, pH 4,5;

Опыт 2: пшенично-чечевично-льняные отруби (гидро модуль 1:10) + МЭК-2, температура 5 °C, pH 5,5.

Выбор pH обусловлен оптимальными значениями для действия собственных кислых протеиназ и фитаз, а также оптимумом действия исследуемых ферментных препаратов. Полученные данные представлены в Таблице 3.

Анализ представленных в Таблице 3 данных свидетельствует о высокой интенсивности гидролиза и об эффективности разработанных МЭК. Так, в исследуемых гидролизатах доля РВ возросла

⁵ ГОСТ 34230–2017 «Продукция соковая. Определение свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии». — М.: Стандартинформ, 2007. — 15 с.

в 2,8 и 2,3 раза (для МЭК-1) и в 3,5 и 2,7 раза (для МЭК-2) по сравнению с автолизатами пшеничных и трехкомпонентных отрубей соответственно. Доля растворимого белка увеличилась в 4,7 и 3,0 раза (МЭК-1) и в 6,4 и 4,2 раза (МЭК-2). Доля растворимого фосфора возрастает в среднем в 3,0–3,5 раза при использовании МЭК-1 и МЭК-2.

Таблица 3. Эффективность МЭК при действии на пшенично-чечевично-льняные отруби

Table 3. Effectiveness of MECs upon action on wheat-lentil-flax bran

Образец	РВ, %	Белок по Лоури, мг/мл	PO ₄ ³⁻ , г/л или мг/мл
Контроль 1	0,18	0,070	0,017
Контроль 1–1	0,22	0,110	0,020
Опыт 1 (с МЭК-1)	0,50	0,330	0,060
Контроль 2	0,20	0,078	0,017
Контроль 2–1	0,26	0,120	0,020
Опыт 2 (с МЭК-2)	0,70	0,500	0,065

Для роста и развития дрожжей рода *Saccharomyces*, используемых в различных технологиях брожения, необходима сбалансированность биохимического состава сбраживаемой среды, доступность азотистого и фосфорного питания. Трехкомпонентные отруби, полученные при совместном размоле зерносмеси, состоящей из злаковых (зерно пшеницы 85%), бобовых (семена чечевицы 10%) и масличных (семена льна 5%) культур, сами по себе обладают уникальным биохимическим составом [15,16]. Ферментативные гидролизаты трехкомпонентных отрубей, полученные с использованием композиций ФП целлюлолитического, протеолитического и фитазного действия, как показали наши исследования, с этой точки зрения могут рассматриваться как активаторы брожения, по сути являясь альтернативой дорогостоящим импортным активаторам брожения на основе автолизатов осадочных дрожжей [19].

Методом гель-хроматографии установлено значительное (в 3–4 раза) повышение доли низкомолекулярных пептидов и аминокислот (М. м. <1000 Да), выходящих с общим объемом колонки (Рисунки 4, 5).

С целью уточнения, какие именно аминокислоты вносят наибольший вклад в увеличение концентрации свободных аминокислот, использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Известно, что дрожжевая клетка может ассимилировать аммиачный азот, большинство аминокислот, кроме пролина, а также ди- и трипептиды. При этом такие аминокислоты, как аспарагиновая кислота, аргинин, валин, гистидин, изолейцин, триптофан, условно относят к хорошо усваиваемым, а аминокислоты лейцин, метионин, тирозин, треонин, серин, лизин — к плохо усваиваемым.

Установлено, что использование разработанных мультэнзимных композиций (МЭК-1 и МЭК-2) приводило к повышению суммарной концентрации свободных аминокислот в опытных образцах гидролизатов в среднем в 2,5–3,0 раза по сравнению с гидролизатами, полученными под действием собственных ферментов сырья (Таблица 4).

При этом концентрация наиболее ценных аминокислот с точки зрения азотного питания дрожжей (аспарагиновой кислоты, аргинина) в опытных гидролизатах трехкомпонентных отрубей повышалась в среднем в 2,5–3,0 раза; количество валина в опытных образцах гидролизатов по сравнению с исходным возрастало

в 5 раз; гистидина и изолейцина — в 2,0–2,5 раза. Это преимущество трехкомпонентных отрубей перед однокомпонентными связано в первую очередь с тем, что изначально белки семян чечевицы и льна содержат значительно больше растворимых белков (альбуминов и глобулинов) [26,27,28], в которых количество указанных выше аминокислот относительно больше по сравнению с зерном пшеницы и ржи [19]. Полученные с использованием направленного биокатализа гидролизаты трехкомпонентных отрубей за счет высокой доли растворимого фосфора, растворимого низкомолекулярного белка и свободных аминокислот могут быть рекомендованы для интенсификации процессов в технологиях брожения.

Таблица 4. Концентрация свободных аминокислот в образцах гидролизатов трехкомпонентных отрубей

Table 4. Concentration of free amino acids in the samples of three-component bran hydrolysates

Образец	Концентрация свободных аминокислот, мг/мл	
	сумма	% от исходного
Пшеничные отруби	943,1	–
Контроль 1	1226,0	130,0
Контроль 1–1	1428,0	151,4
Опыт 1 (с МЭК-1)	3570,0	378,6
Контроль 2	1182,5	125,4
Контроль 2–1	1308,0	138,7
Опыт 2 (с МЭК-2)	3924,0	416,1

Необходимо отметить, что присутствие естественных питательных сред с широким составом аминокислот, к которым относятся гидролизаты зерновых отрубей, значительно повышает ферментативную активность дрожжевых клеток. В этом случае возможна прямая ассимиляция аминокислот дрожжами в процессе их размножения [29,30]. Уровень ассимилируемого азота в среде определяет скорость роста дрожжей, выход биомассы, скорость утилизации сахара и скорость брожения.

4. Выводы

Разработаны и научно обоснованы мультэнзимные композиции (МЭК-1 и МЭК-2) на основе ФП целлюлолитического, протеолитического и фитазного действия.

Исследованы кинетические характеристики ферментных препаратов, входящих в состав мультэнзимных композиций при действии на трехкомпонентные (пшенично-чечевично-льняные) отруби. Определены оптимальные условия для проведения ферментативных реакций: начальная скорость ферментативной реакции, оптимальные температуры и pH, оптимальные концентрации фермента и насыщающая концентрация субстрата.

Показана высокая эффективность разработанных МЭК: доля РВ в исследуемых гидролизатах увеличилась по сравнению с автолизатами пшеничных и трехкомпонентных отрубей в 2,8 и 2,3 раза (МЭК-1) и в 3,5 и 2,7 раза (МЭК-2) соответственно. Количество растворимого белка возросло в 4,7 и 3,0 раза (МЭК-1) и в 6,4 и 4,2 раза (МЭК-2). Доля растворимого фосфора увеличивается в среднем в 3,0–3,5 раза при использовании МЭК-1 и МЭК-2.

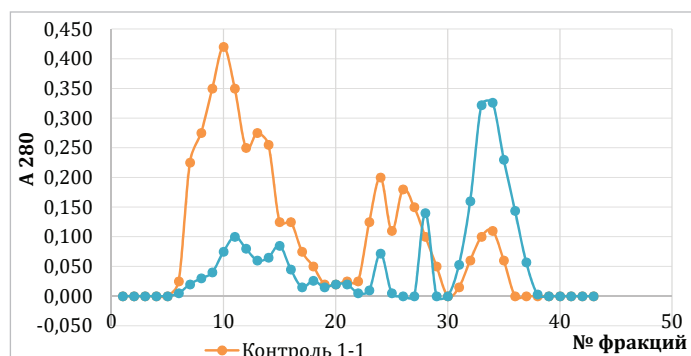


Рисунок 4. Фракционирование продуктов протеолиза методом гель-хроматографии трехкомпонентных отрубей с использованием МЭК-1

Figure 4. Fractionation of proteolysis products by gel chromatography of three-component bran with the use of MEC-1

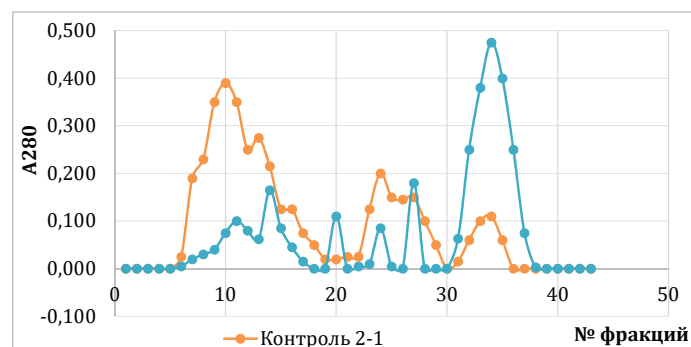


Рисунок 5. Фракционирование продуктов протеолиза методом гель-хроматографии трехкомпонентных отрубей с использованием МЭК-2

Figure 5. Fractionation of proteolysis products by gel chromatography of three-component bran with the use of MEC-2

Методом гель-хроматографии установлено значительное (в 3–4 раза) повышение доли низкомолекулярных пептидов и аминокислот (М. м. <1000 Да), выходящих с общим объемом колонки.

Концентрация наиболее ценных аминокислот с точки зрения азотного питания дрожжей, по результатам ВЭЖХ, аспарагиновой кислоты, аргинина в опытных гидролизатах трехкомпонентных отрубей повышалась в среднем в 2,5–3,0 раза; количество валина в опытных образцах гидролизатов по сравнению с исход-

ным возрастало в 5 раз; содержание гистидина и изолейцина — в 2,0–2,5 раза.

Результаты исследования составят основу дальнейшего изучения возможности использования гидролизатов из зерновых отрубей для обогащения пищевых продуктов легко усваиваемыми компонентами, а также с целью их применения в технологиях брожения на стадии сбраживания в качестве альтернативного источника азотного и фосфорного питания дрожжей.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Римарева, Л. В., Серба, Е. М., Соколова, Е. Н., Борщева, Ю. А., Игнатова, Н. И. (2017). Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности. *Вопросы питания*, 86(5), 63–74. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2017-00078>
2. Толкачева, А. А., Черенков, Д. А., Корнеева, О. С., Пономарев, П. Г. (2017). Ферменты промышленного назначения — обзор рынка ферментных препаратов и перспективы его развития. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*, 79(4), 197–203. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-4-197-203>
3. Bilal, M., Iqbal, H. M. N. (2020). State-of-the-art strategies and applied perspectives of enzyme biocatalysis in the food sector — current status and future trends. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, 60(12), 2052–2066. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1627284>
4. Серба, Е. М., Римарева, Л. В., Оверченко, М. Б., Игнатова, Н. И., Медриш, М. Э., Павлова, А. А. и др. (2021). Подбор мультиэнзимной композиции и условий подготовки концентрированного зернового сусла. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 11(3), 384–392. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-384-392>
5. Rimareva, L. V., Serba, E. M., Overchenko, M. B., Shelekhova, N. V., Ignatova, N. I., Pavlova, A. A. (2022). Enzyme complexes for activating yeast generation and ethanol fermentation. *Foods and Raw Materials*, 10(1), 127–136. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-1-127-136>
6. Зуева, Н. В., Агафонов, Г. В., Корчагина, М. В., Долгов, А. Н., Чусова, А. Е. (2019). Выбор ферментных препаратов и температурно-временных режимов водно-тепловой и ферментативной обработки при разработке комплексной технологии переработки зернового сырья. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*, 81(1), 112–119. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2019-1-112-119>
7. Соколов, Д. В., Болхонов, Б. А., Жамсаранова, С. Д., Лебедева, С. Н., Баженова, Б. А. (2023). Ферментативный гидролиз соевого белка. *Техника и технология пищевых производств*, 53(1), 86–96. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418>
8. Verni, M., Rizzello, C. G., Coda, R. (2019). Fermentation biotechnology applied to cereal industry by-products: Nutritional and functional insights. *Frontiers in Nutrition*, 6, Article 42. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00042>
9. Римарева, Л. В., Оверченко, М. Б., Серба, Е. М., Игнатова, Н. И., Шелехова, Н. В. (2021). Конверсия полимеров зерна пшеницы и кукурузы под влиянием фитолитических и протеолитических ферментов. *Сельскохозяйственная биология*, 56(2), 374–383. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.2.374rus>
10. Серба, Е. М., Римарева, Л. В., Курбатова, Е. И., Волкова, Г. С., Поляков, В. А., Варламов, В. П. (2017). Исследование процесса ферментативного гидролиза биомассы дрожжей для создания пищевых ингредиентов с заданным фракционным составом белковых веществ. *Вопросы питания*, 86(2), 76–83.
11. Погорелова, Н. А., Гаврилова, Н. Б., Рогачев, Е. А., Щетинина, Е. М. (2020). Определение эффективности способов конверсии пшеничных отрубей для использования их в технологии продуктов питания. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 1, 48–57. <https://doi.org/10.36107/spfp.2020.228>
12. Choi, J. M., Han, S. S., Kim, S. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
13. Kaprelants, L., Zhurlova, O. (2017). Technology of wheat and rye bran biotransformation into functional ingredients. *International Food Research Journal*, 24(5), 1975–1979.
14. Витол, И. С. (2023). Эффективность ферментных препаратов при получении гидролизатов из отрубей. *Пищевая промышленность*, 6, 48–50. <https://doi.org/10.52653/PPI.2023.6.6.015>
15. Витол, И. С., Мелешкина, Е. П., Панкратов, Г. Н. (2022). Отруби из композитной зерносмеси — как объект глубокой переработки. Часть 1. Белково-протеиновый комплекс. *Пищевые системы*, 5(4), 282–288. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-282-288>
16. Витол, И. С., Мелешкина, Е. П., Панкратов, Г. Н. (2023). Отруби из композитной зерносмеси как объект глубокой переработки. Часть 2. Углеводно-амилазный и липидный комплексы. *Пищевые системы*, 6(1), 22–28. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-22-28>
17. Kaprelants, L., Zhurlova, O. (2017). Technology of wheat and rye bran biotransformation into functional ingredients. *International Food Research Journal*, 24(5), 1975–1979.
18. Болтовский, В. С. (2021). Ферментативный гидролиз растительного сырья: состояние и перспективы. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук*, 57(4), 502–512. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512>
19. Krikunova, L. N., Meleshkina, E. P., Vitol, I. S., Dubinina, E. V., Obodeeva, O. N. (2023). Grain bran hydrolysates in the production of fruit distillates. *Foods and Raw Materials*, 11(1), 35–42. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-550>
20. Polyakov, V. A., Serba, E. M., Overchenko, M. B., Ignatova, N. I., Rimareva, L. V. (2019). The effect of a complex phytase-containing enzyme preparation on the process of rye wort fermentation. *Foods and Raw Materials*, 7(2), 221–228. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-221-228>
21. Walker, G. M., Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), Article 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
22. Greiner, R., Konietzny, U. (2006). Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 125–140.
23. Nadaroglu, H., Polat, M. S. (2022). Microbial extremozymes: Novel sources and industrial applications. Chapter in a book: *Microbial Extremozymes*. Academic Press, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822945-3.00019-1>
24. Нечаев, А. П., Траубенберг, С. Е., Кочеткова, А. А., Колпакова, В. В., Витол И. С., Кобелева И. Б. (2006). *Пищевая химия. Лабораторный практикум*. СПб: ГИОРД, 2006.
25. Гребенникова, И. В. (2015). *Методы математической обработки экспериментальных данных*. Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2015.
26. Типсина, Н. Н., Батура, Н. Г., Демидов, Е. Л., Белошапкин, М. С. (2020). Характеристика чечевицы и ее использование в пищевой промышленности. *Вестник КрасГАУ*, 11, 225–231. <http://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-11-225-231>
27. Калашникова, С. В., Сысоева, М. Г., Курчаева, Е. Е. (2015). Эмульсионные продукты на основе белковой фракции бобов чечевицы. *Вестник Воронежского государственного аграрного университета*, 3(46), 141–147.
28. Миневиц, И. Э. (2019). Функциональная значимость семян льна и практика их использования в пищевых технологиях. *Health, Food and Biotechnology*, 1(2), 97–120. <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i2.s224>
29. Саршвили, Н. Г., Рейтблат, Б. Б. (2000). Микробиологические основы технологии шампанизации вина. М.: Пищепромиздат, 2000.
30. Панасюк, А. Л., Макаров, С. С. (2018). Влияние различных рас дрожжей на качественные показатели и антиоксидантную активность вин из черной смородины. *Техника и технология пищевых производств*, 48(1), 66–73. <http://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-1-66-73>

REFERENCES

1. Rimareva, L. V., Serba, E. M., Sokolova, E. N., Borshcheva, Yu. A., Ignatova, N. I. (2017). Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. *Problems of Nutrition*, 86(5), 63–74. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2017-00078> (In Russian)
2. Tolкачева, А. А., Cherenkov, D. A., Korneeva, O. S., Ponomarev, P. G. (2017). Enzymes of industrial purpose — review of the market of enzyme preparations and prospects for its development. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, 79(4), 197–203. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-4-197-203> (In Russian)
3. Bilal, M., Iqbal, H. M. N. (2020). State-of-the-art strategies and applied perspectives of enzyme biocatalysis in the food sector — current status and future trends. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, 60(12), 2052–2066. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1627284>
4. Serba, E. M., Rimareva, L. V., Overchenko, M. B., Ignatova, N. I., Medrish, M. E., Pavlova, A. A. et al. (2021). Selecting multi-enzyme composition and preparation conditions for strong wort. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*, 11(3), 384–392. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-384-392> (In Russian)
5. Rimareva, L. V., Serba, E. M., Overchenko, M. B., Shelekhova, N. V., Ignatova, N. I., Pavlova, A. A. (2022). Enzyme complexes for activating yeast generation and ethanol fermentation. *Foods and Raw Materials*, 10(1), 127–136. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-1-127-136>
6. Zueva, N. V., Agafonov, G. V., Korchagina, M. V., Dolgov, A. N., Chusova, A. E. (2019). Selection of enzyme preparations and temperature-time regimes of water-heat and enzymatic treatment in the development of complex technology of processing of grain raw materials. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, 81(1), 112–119. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2019-1-112-119> (In Russian)
7. Sokolov, D. V., Bolkhonov, B. A., Zhamsaranova, S. D., Lebedeva, S. N., Bazhenova, B. A. (2023). Enzymatic hydrolysis of soy protein. *Food Processing: Techniques and Technology*, 53(1), 86–96. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2418> (In Russian)
8. Verni, M., Rizzello, C. G., Coda, R. (2019). Fermentation biotechnology applied to cereal industry by-products: nutritional and functional insights. *Frontiers in Nutrition*, 6, Article 42. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00042>
9. Rimareva, L. V., Overchenko, M. B., Serba, E. M., Ignatova, N. I., Shelekhova, N. V. (2021). Influence of phytolytic and proteolytic enzymes on conversion of

- wheat and corn grain polymers. *Agricultural Biology*, 56(2), 374–383. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.2.374rus> (In Russian)
10. Serba, E. M., Rimareva, L. V., Kurbatova, E. I., Volkova, G. S., Polyakov, V. A., Varlamov, V. P. (2017). The study of the process of enzymatic hydrolysis of yeast biomass to generate food ingredients with the specified fractional composition of protein substances. *Problems of Nutrition*, 86(2), 76–83. (In Russian)
 11. Pogorelova, N. A., Gavrilova, N. B., Rogachev, E. A., Shchetinina, E. M. (2020). Effectiveness of wheat bran conversion methods for use in food technology. *Storage and Processing of Farm Products*, 1, 48–57. <https://doi.org/10.36107/spfp.2020.228> (In Russian)
 12. Choi, J. M., Han, S. S., Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–1454. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
 13. Kaprelants, L., Zhurlova, O. (2017). Technology of wheat and rye bran biotransformation into functional ingredients. *International Food Research Journal*, 24(5), 1975–1979.
 14. Vitol, I. S. (2023). Efficiency of enzyme preparations in obtaining hydrolysates from bran. *Food Industry*, 6, 48–50. <https://doi.org/10.52653/PPI.2023.6.6.015> (In Russian)
 15. Vitol, I. S., Meleshkina, E. P., Pankratov, G. N. (2022). Bran from composite grain mixture as an object of deep processing. Part 1. Protein-proteinase complex. *Food Systems*, 5(4), 282–288. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-282-288> (In Russian)
 16. Vitol, I. S., Meleshkina, E. P., Pankratov, G. N. (2023). Bran from composite grain mixture as an object of deep processing. Part 2. Carbohydrate-amylase and lipid complexes. *Food Systems*, 6(1), 22–28. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-22-28> (In Russian)
 17. Kaprelants, L., Zhurlova, O. (2017). Technology of wheat and rye bran biotransformation into functional ingredients. *International Food Research Journal*, 24(5), 1975–1979.
 18. Boltovsky, V. S. (2021). Enzymatic hydrolysis of plant raw materials: Status and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Science Series*, 57(4), 502–512. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512> (In Russian)
 19. Krikunova, L. N., Meleshkina, E. P., Vitol, I. S., Dubinina, E. V., Obodeeva, O. N. (2023). Grain bran hydrolysates in the production of fruit distillates. *Foods and Raw Materials*, 11(1), 35–42. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-550>
 20. Polyakov, V. A., Serba, E. M., Overchenko, M. B., Ignatova, N. I., Rimareva, L. V. (2019). The effect of a complex phytase-containing enzyme preparation on the process of rye wort fermentation. *Foods and Raw Materials*, 7(2), 221–228. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-221-228>
 21. Walker, G. M., Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), Article 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
 22. Greiner, R., Konietzny, U. (2006). Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 125–140.
 23. Nadaroglu, H., Polat, M. S. (2022). Microbial extremozymes: Novel sources and industrial applications. Chapter in a book: *Microbial Extremozymes*. Academic Press, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822945-3.00019-1>
 24. Nechaev, A. P., Traubenberg, S. E., Kochetkova, A. A., Kolpakova, V. V., Vitol, I. S., Kobleva, I. B. (2006). *Food chemistry. Laboratory practice*. St. Petersburg: GIOR, 2006. (In Russian)
 25. Grebennikova, I. V. (2015). *Methods of mathematical processing of experimental data*. Yekaterinburg: Ural University Press, 2015. (In Russian)
 26. Tipsina, N. N., Batura, N. G., Demidov, E. L., Beloshapkin, M. S. (2020). The characteristics of food lentils and its use in food industry. *The Bulletin of KrasGAU*, 11, 225–231. <http://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-11-225-231> (In Russian)
 27. Kalashnikova, S. V., Sysoeva, M. G., Kurchaeva, E. E. (2015). Emulsion products based on protein fractions of lentils. *Vestnik of Voronezh State Agrarian University*, 3(46), 141–147. (In Russian)
 28. Minevich, I. E. (2019). Functional significance of flax seeds and practice of their use in food technologies. *Health, Food and Biotechnology*, 1(2), 97–120. <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i2.s224> (In Russian)
 29. Sarishvili, N. G., Reitblat, B. B. (2000). *Microbiological bases of wine champagne technology*. Moscow: Food industry. 2000. (In Russian)
 30. Panasyuk, A. L., Makarov, S. S. (2018). Influence of different yeast races on quality parameters and antioxidant activity of wines produced from blackcurrant. *Food Processing: Techniques and Technology*, 48(1), 66–73. <http://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-1-66-73> (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Витол Ирина Сергеевна — кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт зерна и продуктов его переработки 127434, Москва, Дмитровское шоссе, 11 Тел.: +7–926–709–02–07 E-mail: vitolis@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5362-8909 * автор для контактов	Irina S. Vitol , Candidate of Biological Sciences, Docent, Senior Researcher, All-Russian Scientific and Research Institute for Grain and Products of its Processing 11, Dmitrovskoye Shosse, Moscow, 127434, Russia Tel.: +7–926–709–02–07 E-mail: vitolis@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5362-8909 * corresponding author
Мелешкина Елена Павловна — доктор технических наук, директор, Всероссийский научно-исследовательский институт зерна и продуктов его переработки 127434, Москва, Дмитровское шоссе, 11 Тел.: +7–499–976–23–23 E-mail: mep5@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1339-7150	Elena P. Meleshkina , Doctor of Technical Sciences, Director, All-Russian Scientific and Research Institute for Grain and Products of its Processing 11, Dmitrovskoye Shosse, Moscow, 127434, Russia Tel.: +7–499–976–23–23 E-mail: mep5@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1339-7150
Крикунова Людмила Николаевна — доктор технических наук, профессор, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности 119021, Москва, ул. Россолимо, 7 Тел.: +7–910–465–95–88 E-mail: oltiv@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7335-0453	Lyudmila N. Krikunova , Doctor of Technical Sciences, Professor, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry 7, Rossolimo str., Moscow, 119021, Russia Tel.: +7–910–465–95–88 E-mail: oltiv@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7335-0453
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-463-470>

Поступила 31.05.2023

Поступила после рецензирования 24.10.2023

Принята в печать 07.11.2023

© Юшина Ю. К., Семенова А. А., Кузнецова О. А., Сатабаева Д. М., Зайко Е. В., Велебит Б., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ ВИРУСОВ ИЗ ПИЩЕВЫХ МАТРИЦ И ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ КОНТАМИНИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ В ТОРГОВОЙ СЕТИ

Юшина Ю. К.^{1,*}, Семенова А. А.¹, Кузнецова О. А.¹, Сатабаева Д. М.¹, Зайко Е. В.¹, Велебит Б.²

¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Москва, Россия

² Институт гигиены и технологии мяса, Белград, Сербия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

норовирус, гепатит Е, пищевые вирусы, ОТ-ПЦР, ягоды, свиная печень

Экспресс-обнаружение вирусов, в частности норовируса (NoV) и вируса гепатита А (HAV), становится важнейшей задачей контроля безопасности пищевых продуктов. В данном исследовании были рассмотрены различные подходы к извлечению вирусных частиц и способы выделения РНК из пищевых матриц с целью оценки эффективности экстракции менговируса. Эффективность экстракции менговируса из малины составила 14,26%, из устриц — 7,99%, из свиной печени — 8,33%. Была проведена оценка экстракции РНК различными методами. Наибольшая эффективность экстракции менговируса из свиной печени наблюдалась при выделении РНК с помощью полуавтоматической системы eGene up и составила 19,37%. Наименьшая эффективность экстракции была достигнута при выделении РНК ручным способом — 5,31%. При экстракции РНК из устриц максимальная эффективность обеспечивалась с помощью станции для выделения НК AutoPure и набора NucliSENS — 33,35%, а минимальная эффективность наблюдалась при использовании системы eGene up и составила 9,78%. Проведенный мониторинг пищевых продуктов показал, что наибольшая встречаемость норовируса GII была зафиксирована в образцах устриц и составила 9,6% от исследуемых образцов; на втором месте находилась клубника, где встречаемость норовируса GII составила 6,8%. В образцах малины норовирус GII обнаружен не был.

Received 31.05.2023

Accepted in revised 24.10.2023

Accepted for publication 07.11.2023

© Yushina Yu. K., Semenova A. A., Kuznetsova O. A., Satabaeva D. M., Zaiko E. V., Velebit, B., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

ASSESSMENT OF THE EFFICIENCY OF VIRUS EXTRACTION FROM FOOD MATRICES AND THE FREQUENCY OF OCCURRENCE OF CONTAMINATED PRODUCTS IN THE RETAIL NETWORK

Yulia K. Yushina^{1,*}, Anastasia A. Semenova¹, Oksana A. Kuznetsova¹,

Dagmara M. Satabaeva¹, Elena V. Zaiko¹, Branko Velebit²

¹ V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

² Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia

KEY WORDS:

Norovirus, hepatitis E, foodborne viruses, RT-PCR, berries, pork liver

ABSTRACT

Express detection of viruses, in particular, norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV), is becoming an extremely important task for food safety control. This study examines various approaches to recovery of viral particles and methods for RNA extraction from food matrices to assess mengovirus extraction efficiency. Efficiency of mengovirus extraction from raspberry was 14.26%, from oysters 7.99%, from pork liver 8.33%. Assessment of RNA extraction by various methods was carried out. The highest efficiency of mengovirus extraction from pork liver (19.37%) was observed when RNA was extracted using the eGene-up semi-automatic system. The lowest extraction efficiency (5.31%) was achieved upon manual RNA extraction. When RNA was extracted from oysters, the maximum efficiency (33.35%) was ensured by the AutoPure nucleic acid extraction station and NucliSens kit, while the minimum efficiency (9.78%) was observed when using the eGene-up system. The performed monitoring of food products showed that the highest occurrence of norovirus GII was recorded in oyster samples (9.6% of tested samples); the second place was occupied by strawberry, where occurrence of norovirus GII was 6.8%. In the raspberry samples, norovirus GII was not detected.

1. Введение

Долгое время основное внимание в области микробиологического контроля продуктов питания уделялось только бактериальным патогенам, в то время как вирусные возбудители заболеваний вызывали меньший интерес [1,2]. Причиной тому являлась не только сложность обнаружения вирусов, но и тот факт, что присутствие вирусов в пищевых продуктах обычно не связано с изменениями органолептических или сенсорных свойств продукта [3,4]. Меры, применяемые при микробиологическом контроле, не эффективны в случае вирусного заражения. В последнее время в мире растет обеспокоенность гигиенистов в связи с увеличением случаев пищевых отравлений, связанных с норовирусом (NoV) и гепатитом А (HAV), распространяющимися через загрязненную воду, моллюсков, овощи

и мягкие фрукты [5,6,7]. Как показал опыт пандемии ковид-19, не стоит исключать риска передачи через продукты питания даже тех вирусов, которые передаются от человека к человеку [8,9]. Предполагается, что постепенно вирусы могут стать основными возбудителями пищевых инфекций во всем мире [10]. В этой связи обнаружение вирусов в пищевых матрицах имеет важнейшее значение при изучении вспышек инфекций, переносимых через продукты питания.

Весь процесс идентификации пищевых вирусов в основном состоит из трех этапов. На первом этапе вирусные частицы отделяют и при необходимости концентрируют до необходимого объема. Затем проводят выделение генетического материала (РНК), за которым может следовать дополнительная очистка нуклеиновой кислоты. Заключительным этапом является молекулярное обнаружение генетического

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Юшина, Ю. К., Семенова А. А., Кузнецова О. А., Сатабаева, Д. М., Зайко, Е. В., Велебит, Б. (2023). Оценка эффективности экстракции вирусов из пищевых матриц и частоты встречаемости контаминированных продуктов в торговой сети. *Пищевые системы*, 6(4), 463-470. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-463-470>

FOR CITATION: Yushina, Yu. K., Semenova, A. A., Kuznetsova, O. A., Satabaeva, D. M., Zaiko, E. V., Velebit, B. (2023). Assessment of the efficiency of virus extraction from food matrices and the frequency of occurrence of contaminated products in the retail network. *Food Systems*, 6(4), 463-470. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-463-470>

материала вирусов. В некоторых случаях выделение генетического материала может быть выполнено непосредственно из пищевой матрицы, при этом первая стадия разделения и концентрации опускается.

Получение ложноотрицательных и ложноположительных образцов может представлять собой проблему выявления вирусов. Большинство ложноотрицательных результатов является следствием неэффективного выделения вируса/нуклеиновых кислот из анализируемых матриц или ингибирования обратной транскрипции (ОТ), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и молекулярных методов в целом. Большинство ложноположительных результатов обусловлены перекрестным загрязнением, которое может произойти почти на любом этапе аналитической процедуры. Соответствующая система положительного и отрицательного контроля всей процедуры может обеспечить подходящее решение и поэтому должна быть использована при исследовании [11].

Первый этап аналитической процедуры обычно состоит из отделения вирусных частиц от матрицы и их концентрации. Это критический момент в большинстве протоколов по выявлению вирусных частиц в продуктах питания. Методы экстракции вирусов, как правило, могут быть классифицированы в соответствии с исследуемой матрицей. Их можно разделить на подходы, применимые к продуктам углеводной природы, которые содержат большое количество воды (в основном фрукты и овощи), и на подходы, подходящие для продуктов с высоким содержанием жира и белка (например, мясо и мясные продукты). Отдельная категория методов — это методы для контроля вирусов в моллюсках, которые представляют собой довольно специфическую матрицу из-за их способности концентрировать вирусные частицы.

Экстракция вирусов из ягод (малина, клубника и др.) является сложной задачей главным образом из-за их хрупкой текстуры и различных веществ в ягодном соке, которые препятствуют обнаружению вируса с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [12]. Фенолы и полифенолы (например, антоциан, флавонол, эллагитанин, проантоцианидин, фенольные кислоты, дубильная кислота) могут связывать нуклеиновые кислоты (НК), тем самым ингибировать реакцию ОТ-ПЦР. Кроме того, первичная клеточная стенка растений содержит структурный гетерополисахарид, пектин, который также ингибирует реакции ОТ-ПЦР [13]. Ингибиторы в сочетании с низкой эффективностью элюирования вируса из ягод часто снижают чувствительность обнаружения и могут привести к ложноотрицательным результатам [14]. В связи с этим важно использовать подходы, позволяющие минимизировать влияние ингибиторов, содержащихся в ягодах.

Свиная печень и продукты из свиной печени являются наиболее частыми источниками гепатита Е (HEV).

У свиней это заболевание передается в основном фекально-оральным путем. Они начинают выделять вирус с фекалиями в течение двух месяцев [15]. Инфицированные свиньи обычно не проявляют каких-либо явных клинических симптомов, хотя в некоторых случаях у них может развиваться острый самоограничивающийся гепатит легкой и средней степени тяжести [16]. Как следствие, свиньи, инфицированные HEV, поступают на бойню как здоровые животные, и, следовательно, их ткани и мясо могут представлять опасность для потребителей.

Большинство вирусов пищевого происхождения трудно или невозможно культивировать [17]. Для их обнаружения в образцах пищевых продуктов и окружающей среды используются чувствительные молекулярные методы. Сегодня ОТ-ПЦР широко применяется для обнаружения вирусов, поскольку она чувствительна, специфична, быстра и может предоставлять количественные данные. Тем не менее эффективность молекулярных методов сильно варьируется. Проблемы возникают в связи с различным матричным составом, с высокой вариабельностью последовательности вирусов и с наличием ингибиторов. При выборе подходящего метода необходимо учитывать характеристики как конкретной специфической матрицы, в которой выполняется обнаружение, так и потенциально присутствующих вирусных агентов [18].

Учитывая вышеописанную проблематику, цель работы состояла в оценке эффективности экстрагирования вирусных частиц из пищевых матриц и выделения РНК с использованием различных подходов, а также в предварительной оценке распространенности вирусов в пищевых продуктах российского производства.

2. Объекты и методы

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были взяты образцы малины, клубники, устриц и свиной печени. Образцы малины, клубники и свиной печени (в потребительской упаковке массой от 0,5 до 1,0 кг) были получены в точках розничной торговли Москвы и Московской

области. Устрицы были выращены в Приморском крае, Южно-Сахалинске, Владивостоке, Республике Крым и доставлены на исследования в вакуумных упаковках по 15–20 штук. Для оценки эффективности подходов по извлечению целевых вирусов из образцов и эффективности выделения РНК был взят менговирус, штамм VMCO (*Mengovirus Extraction Control kit KMG*, bioMérieux, Франция) (далее — контрольный вирус). Этот вирус обладает структурными, физико-химическими и другими аналогичными свойствами большинства кишечных вирусов, что делает его современной морфологической, физико-химической и генетической моделью для мониторинга вирусов [18,19].

2.2. Подготовка реактивов

Реактивы, использованные в работе, приведены в Таблице 1 и описаны ниже.

Таблица 1. Реактивы, используемые в работе

Table 1. Reagents used in the work

№	Наименование реактива	Составные компоненты	Производитель, страна
1	5 × полиэтиленгликоль/хлорид натрия (PEG/NaCl)	Полиэтиленгликоль (PEG) 8000	Sigma-Aldrich, Швейцария
		Хлорид натрия (NaCl)	ООО «МЗХР», Россия
2	Хлороформа/бутанола	Хлороформ	Scharlab, Испания
		n-Бутанол	neoFroxx, Германия
3	Буфер Трис/глицин/говяжий экстракт (TGBE)	Трис основа [tris(hydroxymethyl)aminomethane]	neoFroxx, Германия
		Глицин	neoFroxx, Германия
		Порошок экстракта говядины	Becton, Dickinson, Франция
4	Буфер Трис/ЭДТА (ТЕ)	Трис раствор (1 моль/л)	neoFroxx, Германия
		ЭДТА раствор (0,5 моль/л)	neoFroxx, Германия

2.2.1. Раствор 5 × полиэтиленгликоль/хлорид натрия (PEG/NaCl)

В 450 мл воды растворяли 500 г полиэтиленгликоля и 87 г хлорида натрия. Объем доводили до 1000 ± 10 мл воды и хорошо перемешивали. Полученный раствор стерилизовали в автоклаве при 120 °С в течение 15 минут.

2.2.2. Смесь хлороформа/бутанола

В лабораторной посуде смешивали 10 мл хлороформ и 10 мл n-Бутанол. Полученную смесь хранили в темном месте в бутылках из темного стекла.

2.2.3. Буфер Трис/глицин/говяжий экстракт (TGBE)

В 800 мл воды растворяли 12,1 г основы Трис [tris(hydroxymethyl)aminomethane], 3,8 г глицина, 10,0 г порошка экстракта говядины, при необходимости поднимали уровень pH до 9,5 ± 0,2 при 25 °С. Общий объем доводили до 1000 ± 10 мл воды и хорошо перемешивали. Полученный буфер стерилизовали в автоклаве (СПВА-75-1-нн, «Транс Сигнал», Россия) при 120 °С в течение 15 минут. Стерильный буфер хранили при температуре 5 ± 1 °С.

2.2.4. Буфер Трис/ЭДТА (ТЕ) (10 ммоль/л Трис, 1 ммоль/л ЭДТА)

Для получения буфера ТЕ, содержащего 10 ммоль/л Трис и 1 ммоль/л ЭДТА, смешивали 1000 мкл раствора Трис (1 моль/л) и раствора ЭДТА (0,5 моль/л). Буфер хранили при 5 °С.

2.3. Экстракция вируса

2.3.1. Экстракция вируса из ягод

25,0 г образца переносили в отделение для образцов сетчатого фильтровального пакета емкостью 400 мл. Затем к образцу добавляли 10 мкл контрольного вируса и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. По завершении инкубирования в образец вносили 40 мл TGBE. Далее добавляли к образцам не менее 30 Ед пектиназы из *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Швейцария). Образцы инкубировали на шейкере Multi Bio 3D (Biosan, Латвия) при комнатной температуре и 60 об/мин в течение 20 мин. Во время инкубирования образцов ягод тест-полосками (Merk, Германия) измеряли pH экстракта каждые 10 мин. При снижении уровня pH ниже 9,0 смесь подщелачивали до 9,5 ± 0,5 с использованием водного раствора NaOH (≥ 10 моль/л) (Millipore, Sigma-Aldrich, Германия)

и инкубировали еще 10 мин. Затем pH измеряли еще раз, при необходимости подщелачивали смесь и продолжали инкубирование. Экстракт из отделения для отфильтрованного материала переносили в центрифужные пробирки объемом 50 мл. Экстракт центрифугировали при 10000 об/мин при температуре 5 °C в течение 15 мин в центрифуге Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия). Супернатант переносили в отдельные чистые фальконы и доводили pH до 7,0 с использованием водного раствора HCl (≥ 5 N) (Charlab, Испания). К полученному экстракту добавляли $\frac{1}{4}$ объема супернатанта PEG/NaCl 5X для получения конечной концентрации 1X (100 г/л PEG и 0,3 M NaCl). Смесь гомогенизировали встряхиванием в течение 60 с и инкубировали в шейкере Multi Bio 3D (Biosan, Латвия) при 60 об/мин и 5 °C в течение 60 мин. По окончании инкубирования смесь центрифугировали при 10000 об/мин и температуре 4–5 °C в течение 30 мин. Затем удаляли осадок и проводили повторное центрифугирование при 10000 об/мин и температуре 4–5 °C в течение 5 мин для уплотнения. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS, AppliChem, Германия) если объем осадка оказывался значительным, применялось до 1000 мкл фосфатно-солевого буфера. Полученный раствор переносили в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 500 мкл смеси хлороформ/бутанол (1:1), интенсивно встряхивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем образец центрифугировали при 10000 об/мин и 4–5 °C в течение 15 мин и переносили водную фазу (400–500 мкл) в чистую пробирку. Полученный экстракт сразу же подвергали экстрагированию вирусной РНК.

2.3.2. Экстракция вируса из двусторчатых моллюсков

Для анализа отбирали не менее 10 моллюсков. Панцирь открывали стерильным ножом. Пищеварительные железы вырезали с использованием ножниц и пинцетов, и переносили в стерильные чашки Петри. Общая масса желез для исследования составляла не менее 2 г. Пищеварительные железы измельчали скальпелем до пастообразной консистенции. Затем 2 г полученного образца переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Пищеварительные железы сразу же подвергали экстракции вируса. В каждую пробирку с образцом вносили 10 мкл контрольного вируса процесса и 2 мл раствора протеиназы К (neoFroxx, Германия), перемешивали и инкубировали в шейкере (320 оборотов/мин) при 37 °C в течение 60 мин. По окончании лизиса проводили повторное инкубирование при 60 °C в течение 15 мин, поместив пробирку в водяную баню WB-4MS (BioSan, Латвия). Полученный раствор центрифугировали на центрифуге Eppendorf MiniSpin, (Eppendorf, Германия) при 3000 об/мин и комнатной температуре в течение 5 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и измеряли его объем. Объем полученного раствора записывали. Полученный экстракт незамедлительно подвергали экстрагированию вирусной РНК.

2.3.3. Экстракция вируса из свиной печени

Образец свиной печени массой 100 мг вносили в пробирки с керамическими шариками (Bertin Technologies, Франция), добавляли 1 мл тризола (Invitrogen, США) и $10 \pm 0,5$ мкл вируса для контроля процесса. Пробирку помещали в гомогенизатор Minilys (Bertin Technologies, Франция) при 5000 об/мин на 3 минуты.

После деструкции образцов тризолом в пробирку вносили 200 мкл хлороформа (Scharlab, Испания). Затем незамедлительно перемешивали на вортексе MSV-3500 (Biosan, Латвия) и оставляли на 5 минут при комнатной температуре. По истечении времени центрифугировали при 13,5 тыс. оборотов в минуту в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отбирали в отдельные пробирки. Полученный экстракт подвергали экстрагированию вирусной РНК.

2.4. Экстракция РНК

Из образцов двусторчатых моллюсков экстрагировали РНК из 500 мкл полученного образца, во всех остальных случаях использовали всю экстрагированную жидкость.

Для каждой партии тестируемых образцов был включен отрицательный контроль экстракции РНК.

Для оценки эффективности экстракции РНК и с целью создания стандартной кривой для определения эффективности экстракции вируса для каждой партии исследуемых образцов было дополнительно взято 10 мкл контрольного вируса известной концентрации и добавлено 490 ± 10 мкл воды для молекулярных исследований. Также была проведена экстракция РНК, которая выполнялась тремя различными методами, описанными ниже.

2.4.1. Экстракция РНК с помощью реагентов NucliSENS ручным методом

Для экстракции РНК добавляли 2 мл буфера для лизиса NucliSENS (bioMérieux, Франция) в пробирку и кратковременно перемешивали встряхиванием, затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Добавляли 50 мкл предварительно перемешанного раствора магнитного диоксида кремния в пробирку, кратковременно перемешивали встряхиванием и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали в течение 120 с при 1500 об/мин или давали оксиду кремния отстояться с помощью магнитного штатива и осторожно удаляли супернатант. Убирали пробирки с магнитного штатива и добавляли 400 мкл буфера NucliSENS1 для экстракции, осадок ресуспендировали встряхиванием, стараясь избежать пенообразования. Пробирки с образцами помещали на магнитный штатив, затем ожидали полного оседания магнитных частиц и аккуратно удаляли супернатант. Этап очистки буфером NucliSENS1 для экстракции повторяли. Супернатант полностью удаляли. Пробирки снимали с магнитного штатива, добавляли 500 мкл буфера NucliSENS2 для экстракции и интенсивно встряхивали в течение 30 с. Затем давали оксиду кремния осесть с помощью магнитного штатива и аккуратно удаляли супернатант. Этап очистки буфером NucliSENS2 для экстракции повторяли еще раз. Супернатант полностью удаляли. Пробирки снимали с магнитного штатива и добавляли 500 мкл буфера NucliSENS3 для экстракции. Осадок ресуспендировали встряхиванием, стараясь избежать пенообразования. Пробирки с образцами помещали на магнитный штатив и давали осесть магнитным частицам, затем аккуратно удаляли супернатант. Пробирки убирали с магнитного штатива и вносили 100 мкл буфера NucliSENS3 для экстракции, предварительно нагретого до 60 °C. Образцы перемешивали 4–5 раз путем встряхивания. Полученные пробирки ставили на шейкер при 60 °C на 5 минут. По истечении времени инкубирования пробирки помещали на магнитный штатив, всю жидкость переносили в чистые пробирки. Полученную РНК использовали для проведения ПЦР.

Экстрагированную РНК использовали сразу же или хранили при 5 °C максимально 24 ч, при — 15 C или ниже — до 6 мес.

2.4.2. Экстракцию РНК с помощью полуавтоматической системы eGene up (bioMérieux, Франция) и с помощью наборов лабораторных реагентов для выделения РНК innuPREP RNA MiniKit 2.0 (AnalytikJena, Германия) проводили согласно инструкции производителя.

2.4.3. Экстракция РНК с помощью автоматической станции выделения РНК Auto-Pure 96.

Для экстракции РНК добавляли 2 мл буфера для лизиса NucliSENS в пробирку и кратковременно перемешивали встряхиванием, затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Далее вносили 50 мкл предварительно перемешанного раствора магнитного диоксида кремния в пробирку, кратковременно перемешивали встряхиванием и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали в течение 120 с при 1500 об/мин в центрифуге Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Германия) и добавляли по 2 мл в чистую плашку. В каждую плашку для каждого образца вносили по одной лунке буфера NucliSENS1 объемом 400 мкл для экстракции. Также во все плашки для всех образцов вливали по одной лунке буфера NucliSENS2 объемом 500 мкл для экстракции. Добавляли 500 мкл буфера NucliSENS3 в одну плашку. Также в отдельную чистую плашку вносили 100 мкл буфера NucliSENS3. Далее следовали инструкции производителя.

2.4.4. ОТ-ПЦР в реальном времени

Для идентификации вирусных геномов использовали одноэтапную ОТ-ПЦР на приборе Gene up (bioMérieux, Франция) в режиме реального времени с гидролизруемыми зондами. Для определения норовируса применяли набор для обнаружения норовируса генотипы II (NoVGII) (bioMérieux, Франция); для выявления вируса гепатита E использовали набор для обнаружения вируса гепатита E (HEV) (bioMérieux, Франция); для определения менговируса использовали набор для обнаружения менговируса (bioMérieux, Франция). Каждая постановка ПЦР включала положительный и отрицательный контроли, входящие в состав наборов.

2.5. Интерпретация результатов

Сигнал флуоресценции для внутреннего контроля исследуемого образца считывался по каналу VIC, а сигнал для обнаружения РНК вируса для контроля процесса, положительного и отрицательного

контролей ПЦР, а также РНК искоемых вирусов определялся по каналу FAM. Значение порогового цикла (Ct) меньше 40 циклов считалось положительным результатом.

Для оценки параметров качества проведенных исследований строили калибровочный график. Для этого использовали результаты ПЦР для серий разведений РНК контрольного вируса. Построение калибровочного графика и оценку его параметров проводили с помощью программного обеспечения прибора Gene up (bioMérieux, Франция). С целью определения силы взаимосвязи между переменными (степени прямолинейности) использовали коэффициент корреляции Пирсона (r^2), за допустимые значения которого принимали значения от 0,98 и выше. В качестве другого параметра оценки калибровочного графика использовали значение наклона кривой (m), показатели которого должны находиться в пределах от $-3,1$ до $-3,6$, что соответствует эффективности амплификации от 90% до 110%.

Эффективность экстракции вируса считали успешной при его экстракции более 1%. Экстракцию контрольного вируса (р,%) в общем случае рассчитывали по формуле:

$$p = 10(\Delta Ct/m) \times 100,$$

где ΔCt — разность пороговых циклов амплификаций (Ct) исследуемой и неразведенной концентрации РНК контрольного вируса;
 m — наклон калибровочного графика РНК контрольного вируса.

В случаях, когда пищевой матрицей были образцы устриц, окончательный расчет эффективности экстракции вируса проводили следующим образом:

$$E = (p/0,5) \times v,$$

где p — экстракция контрольного вируса;
 v — общий измеренный объем супернатанта в мл.

2.6. Статистическая обработка

Данные были выражены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. При оценке эффективности экстрагирования вирусов эксперимент проводили в трех повторах. Анализ значимости полученных результатов проводили с использованием критерия хи-квадрат Пирсона. Различия считались значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$. Для статистической обработки данных применяли программное обеспечение STATISTICA 12.0.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Оценка эффективности экстрагирования вирусов и способов выделения РНК

Оценку эффективности экстрагирования вирусов при использовании ручного, полуавтоматического и автоматического способов выделения РНК начинали с построения калибровочных графиков. С этой целью были получены значения порогового цикла амплификаций (Ct) для серии концентраций контрольного вируса (Таблица 2). Также были построены калибровочные графики для расчета параметров прямой (Рисунок 1), соответствующие трем способам выделения РНК.

Таблица 2. Пороговый цикл амплификации (Ct) менговируса в зависимости от способа выделения РНК

Table 2. Threshold cycle (Ct) of amplification of mengovirus depending on the method for RNA extraction

Объекты	Значение Ct		
	Ручной способ с набором innuPREP RNA MiniKit 2.0 (а)	Станция AutoPure и набор NucliSENS (б)	eGene up (в)
Менговирус 100%	25,15 $\pm$ 0,40	25,55 $\pm$ 0,29	24,19 $\pm$ 0,03 ^{аб}
Менговирус 10%	28,39 $\pm$ 0,37	29,32 $\pm$ 0,15 ^а	27,24 $\pm$ 0,21 ^{аб}
Менговирус 1%	32,48 $\pm$ 0,31	32,40 $\pm$ 0,27	30,60 $\pm$ 0,16 ^{аб}
Менговирус 0,1%	35,49 $\pm$ 0,23	35,62 $\pm$ 0,34	34,54 $\pm$ 0,36

Примечание: * — различия статистически значимые, $p < 0,05$.

Как видно из Таблицы 2, пороговый цикл амплификаций менговируса зависел от способа выделения РНК, при этом достоверные различия наблюдались для средних значений, полученных при концентрациях 1%, 10% и 100%, главным образом при автоматическом способе выделения РНК. На основе данных калибровочных графиков (Рисунок 1) были рассчитаны их параметры для оценки приемлемости результатов. Данные представлены в Таблице 3.

При использовании автоматического способа калибровки значения коэффициента r^2 , характеризующего прямолинейность калибровочного графика, было немного выше, чем для ручного и полуавтоматического методов выделения РНК.

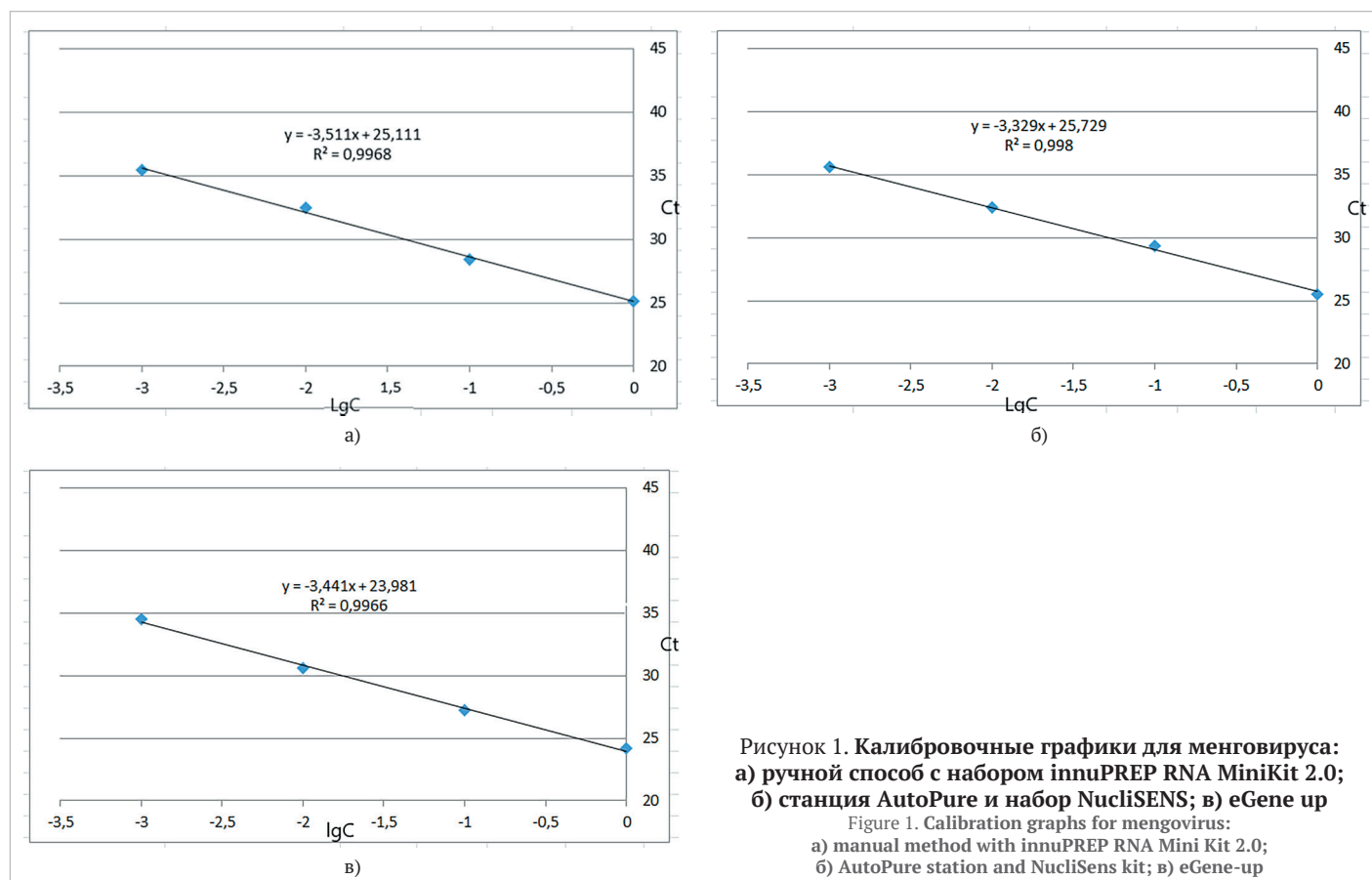


Рисунок 1. Калибровочные графики для менговируса: а) ручной способ с набором innuPREP RNA MiniKit 2.0; б) станция AutoPure и набор NucliSENS; в) eGene up

Figure 1. Calibration graphs for mengovirus:

а) manual method with innuPREP RNA Mini Kit 2.0;
 б) AutoPure station and NucliSENS kit; в) eGene-up

Таблица 3. Оценка параметров калибровочных графиков в зависимости от способа выделения РНК

Table 3. Assessment of parameters of calibration graphs depending on the method for RNA extraction

Способ выделения РНК менговируса	Коэффициент корреляции Пирсона (r^2)	Наклон (m)
Приемлемые значения	$>0,980$	От $-3,10$ до $-3,60$
Ручной способ с набором innuPREP RNA MiniKit 2.0	0,996	$-3,51$
Станция AutoPure и набор NucliSENS	0,998	$-3,33$
eGene up	0,996	$-3,44$

Полученные данные по корреляции между двумя переменными (r^2) показали высокие положительные линейные связи — от 0,996 до 0,998 в зависимости от способа выделения РНК. Наклон кривой находился в пределах от $-3,33$ до $-3,51$, что соответствовало приемлемым требованиям.

С использованием калибровочных графиков, полученных для серии разведений менговируса (Рисунок 1), были проведены дальнейшие исследования и оценена эффективность экстракции менговируса из различных пищевых матриц (малины, устриц и свиной печени) (Рисунок 2).

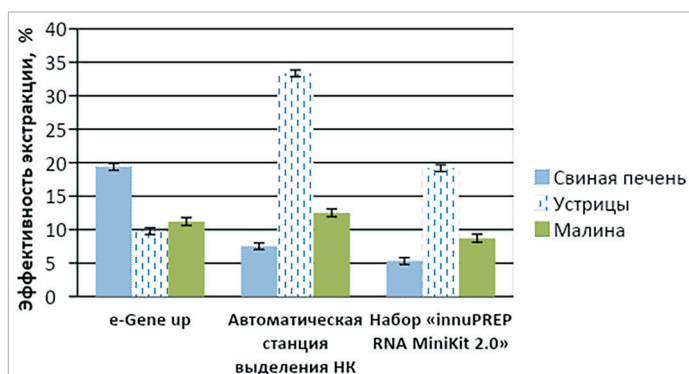


Рисунок 2. Эффективность экстракции менговируса из различных пищевых матриц

Figure 2. Efficiency of mengovirus extraction from various food matrices

Наибольшая эффективность экстракции менговируса из свиной печени наблюдалась при выделении РНК с помощью системы eGene up и составила 19,37%. Наименьшая эффективность экстракции наблюдалась при выделении РНК ручным способом — 5,31%. При экстракции РНК из устриц наибольшая эффективность была достигнута с использованием станции для выделения НК AutoPure и набора NucliSENS и составила 33,35%, а наименьшая экстракция наблюдалась при использовании системы eGene up и составила 9,78%. Эффективность экстракции вируса из малины находилась в пределах от 8,7% до 12,5%, где наименьшее значение было получено при экстракции РНК с помощью автоматической станции выделения НК.

Отмечена зависимость эффективности экстракции РНК от пищевой матрицы. Полуавтоматическая станция выделения РНК eGene up показала наилучшую эффективность при экстрагировании РНК из свиной печени. Эффективность экстракции РНК автоматической станцией выделения из устриц была выше более чем в два раза по сравнению с другими матрицами. Такая же ситуация наблюдалась и при использовании ручного набора для получения НК, где эффективность экстракции РНК из устриц также была выше. Тем не менее следует отметить, что, согласно принятым стандартам, эффективность более 1% считается удовлетворительной, и все методы выделения РНК из пищевых матриц показали свою работоспособность.

Как отмечалось выше, выявление вирусов в пищевых продуктах является сложным и поэтапным процессом [18]. Примененный в настоящей работе полиэтиленгликоль (ПЭГ) для концентрирования вируса и удаления ингибиторов из ягод широко применяется в подобных исследованиях [14,20,21]. Ранее было показано, что метод прямой экстракции вирусов из малины позволил достичь значительно более высокой эффективности экстракции норовируса (46,2%) и F-специфического РНК-бактериофага GA, чем метод на основе осаждения ПЭГ [22]. Однако в другом сравнительном исследовании именно способ с однократной обработкой ПЭГ образцов малины показал наилучший результат по экстрагированию вирусов

и позволил обнаружить норовирус в концентрации 10^2 копий на 50 г замороженной малины [23]. Наше исследование также продемонстрировало, что подходы с использованием ПЭГ для извлечения вирусов из малины дают эффективный результат.

В связи с тем, что фрукты и ягоды содержат ингибиторы реакций, в том числе прямой цепной реакции (ПЦР), многие исследователи настаивают на необходимости дополнительной очистки экстрактов от ингибиторов. Так, Bartsch и соавторы [24] использовали колонки Mobispin S400 для очистки РНК, выделенной из клубники. Однако наши результаты показали, что малина как пищевая матрица для определения вирусов не представляет значительных трудностей. Выбранные подходы позволили провести достаточно успешную экстракцию вируса.

Для экстракции вируса из устриц был применен метод, основанный на расщеплении белков протеиназой К и высвобождении вирусных частиц в раствор. Мы получили эффективности экстракции контрольного вируса из этой пищевой матрицы от 9,78 до 33,35% в зависимости от способа экстракции РНК. В ряде других исследований показано, что в зависимости от выбранного подхода эффективность экстракции вируса из устриц может значительно варьироваться и составлять до 13,2% [25,26]. Среди предлагаемых методов извлечения вирусных частиц рассматриваются такие подходы, как прямое выделение нуклеиновых кислот из пищеварительных желез устриц, элюирование и концентрирование вируса, с различной чувствительностью и эффективностью извлечения [27,28,29]. Le и др. [30] разработали метод экстракции и количественного определения норовируса из моллюсков, основанный на экстракции РНК тризолом с последующей стадией очистки с применением цетилтриметиламмония бромид и осаждения хлоридом лития. Этот метод обеспечил значительно более высокую эффективность по сравнению с методом экстракции протеиназой К, используемым в нашем исследовании. Тризол обладает превосходной способностью к лизису для экстракции вирусной РНК из моллюсков [30]. Однако этап разделения фаз и дополнительные этапы очистки делают метод более трудозатратным для аналитиков. Кроме того, дополнительные этапы потенциально могут приводить к потере вирусной РНК в процессе выделения. В рамках контроля безопасности приоритетными являются простые и доступные подходы по извлечению вирусов, позволяющие получить быстрый и достоверный результат о возможной контаминации.

Подбор эффективных методов извлечения генетического материала является первоочередной задачей для успешного выявления пищевых вирусов. Различные способы выделения нуклеиновых кислот по-разному эффективны, по этой причине их выбор для данной цели должен быть тщательно продуман [31,32]. Оценки и сравнения различных методов экстракции проводятся постоянно с различными типами образцов и вирусами-мишенями [33,34,35]. Считается, что ручная экстракция нуклеиновых кислот (НК) из образцов является наиболее трудоемкой среди современных методов экстракции НК. Ранее было показано, что использование автоматизированных способов экстракции НК считается приемлемым. Возможно, такой подход является превосходной заменой ручных методов: автоматизация позволяет сокращать рабочее время специалистов и снижать риск допущения ошибок, связанных с человеческим фактором [36,37]. Ручные методы извлечения НК по-прежнему остаются хорошей альтернативой для получения качественного генетического материала. Однако, например, при выделении РНК вируса из свиной печени автоматизированные системы показали более эффективный результат.

Так, Perrin и соавторы [22] установили, что применение автоматизированной системы вместо полуавтоматической системы NucliSENS MiniMAG, аналога eGene up, используемого в данном исследовании, позволило получить концентрацию вируса в среднем в 1,3 раза больше. В связи с этим можно предположить, что автоматизированная система извлекает вирусную РНК более эффективно, чем NucliSENS MiniMAG.

Экстракция с помощью автоматических систем является улучшением по сравнению с экстракцией ручными или полуавтоматическими методами с точки зрения удобства применения, хотя полученные результаты свидетельствуют о приемлемости использования и тех и других систем, согласно полученным результатам исследования эффективности экстракции с точки зрения извлечения РНК. Все три метода позволили эффективно провести выделение и очистку вируса (на примере менговируса). Полученные результаты показали, что все выбранные способы подходят для выделения и очистки РНК из пищевых продуктов. А возможность использования автоматической экстракции РНК может привести к значительному сокращению общего времени исследования.

Результаты оценки эффективности разных методов важны для определения эффективности экстракции нуклеиновых кислот и удаления ферментов ингибиторов, поскольку они оказывают непосредственное влияние на результат анализа амплификации.

Для проведения дальнейших исследований нами был сделан выбор в пользу автоматической станции выделения НК, так как полученные данные сравнительных исследований позволяют сделать вывод о ряде преимуществ автоматического метода.

3.2. Оценка распространенности вирусов в пищевых продуктах

Распространенность норовируса и гепатита Е оценивали в образцах продуктов, представленных на внутреннем рынке и выбранных с учетом анализа распространенности пищевых вирусов в продовольствии [2,6,47]. Были исследованы: на норовирус — 52 образца устриц, 44 образца клубники и 31 образец малины; на гепатит Е — 82 образца свиной печени. Все образцы устриц, клубники и малины были проанализированы на наличие норовируса геногруппы GII, а образцы устриц дополнительно проверялись на наличие норовируса геногруппы GI. Для всех образцов в качестве контрольного вируса использовали менговирус. Учет результатов проводили только в тех образцах, где эффективность экстракции менговируса составляла более 1%.

В качестве примера ниже представлены кривые амплификации для положительных образцов (образец 9 при исследовании клубники (Рисунок 3а); образцы 6, 9, 11 и 12 при исследовании устриц (Рисунки 3б и 3в)). Значения C_t для положительных образцов находились в пределах до 40 циклов.

Наибольшая встречаемость норовируса GII была зафиксирована в устрицах и составила 7,7% от общего количества исследуемых образцов; на втором месте находилась клубника, где встречаемость норовируса GII составила 4,5% от исследуемых образцов. В образцах малины норовирус GII обнаружен не был. Также в образцах свиной печени не было выявлено гепатита Е (Таблица 4).

Таблица 4. Оценка выявляемости пищевых вирусов в продуктах питания

Table 4. Assessment of detection rate of foodborne viruses in food products

Вирус	Количество исследованных образцов, шт (% положительных к общему количеству исследованных образцов)				Общая
	Устрица (а)	Малина (б)	Клубника (в)	Свиная печень (г)	
Норовирус GI	45(0%)	—	—	—	45(0%)
Норовирус GII	52(9,6%)* _г	31(0%)	44(6,8%)* _г	—	127 (7,21%)
Гепатит Е	—	—	—	82(0%)	82(0%)

Примечание: * — различия статистически значимые, $p < 0,05$.

По результатам исследования образцов устриц было установлено, что среднее значение C_t в положительных образцах составляло $35,07 \pm 1,30$ циклов, в то время как минимальное значение C_t было 32,39, а максимальное — 39,88 циклов (Таблица 5). Для кривых амплификации при исследовании клубники значение C_t положительных образцов было установлено на более поздних циклах амплификации и находилось в пределах от 35,80 до 39,36 циклов, при этом среднее значение составило $37,13 \pm 1,12$ циклов. Чем меньше значение показателя C_t , тем выше нагрузка вирусной РНК в образце. Полученные данные свидетельствуют о различном количестве генетического материала в исследованных образцах.

Таблица 5. Значения C_t для образцов, положительных на норовирус GII

Table 5. C_t values for the samples positive for norovirus GII

Значение C_t	Устрицы	Клубника
Среднее $\pm$ стандартное отклонение	$35,07 \pm 1,30$	$37,13 \pm 1,12$
Минимальное	32,39	35,80
Максимальное	39,88	39,36

Моллюски и ягоды были установлены в качестве основных источников заражения человека норовирусом во многих зарубежных исследованиях [38,39,40]. Полученные результаты по исследованию устриц и клубники подтверждают актуальность мониторинга на норовирус этих продуктов на внутреннем рынке от отечественных производителей.

В нашей работе именно устрицы в большей степени были контаминированы норовирусом. Это может быть связано с тем, что устрицы способны биоаккумулировать вирусы в своих пищеварительных тканях из-за присутствия антигенов, подобных человеческой гистогруппе крови (HBGA-подобные антигены) [7,41]. Такая ситуация представляет опасность для здоровья населения, поскольку устрицы и мидии часто употребляются в сыром или недоваренном виде. В трудах зарубежных ученых количество инфицированных норовирусом устриц превышает показатели, приведенные в нашей работе. Так, в исследовании [41] 53,1% образцов мидий дали положительный результат на РНК норовируса, при этом 31,6% всех образцов показали одновременное присутствие как норовируса GI, так и норовируса GII. В устрицах РНК норовируса была обнаружена в 31,6% образцов с одновременным присутствием РНК норовируса GI и GII в 10,2% образцов [41]. Генотип норовируса GI в нашем исследовании обнаружен не был, хотя норовирус GII признан вирусом, наиболее часто выявляемым в образцах пищевых продуктов [37].

Распространенность норовируса GII в клубнике отечественного производства была ниже, чем в других странах, при мониторинге различных ягод на наличие вируса. Так, исследование 900 образцов замороженных и 900 образцов свежих ягод, используемых для внутреннего потребления в Китае в 2016–2017 годах, показало, что РНК норовируса была обнаружена в 109 образцах свежих ягод (12,1%) [42]. В Соединенном Королевстве в ходе анализа 310 образцов свежей малины и 274 образцов замороженной малины семь образцов свежей малины (2,3%) и 10 образцов замороженной малины (3,6%) дали положительный результат на РНК норовируса [43]. Возможно, такие небольшие значения присутствия норовируса в нашем исследовании связаны с относительно небольшой выборкой образцов.

Инфицирование гепатитом Е может происходить несколькими путями. В развивающихся странах основным способом передачи по-прежнему остается употребление фекально загрязненной воды. Однако в промышленно развитых странах основным путем заражения является потребление загрязненных пищевых продуктов [44,45]. Гепатит Е не был обнаружен ни в одном из исследованных образцов. Схожие результаты были получены в Словении при мониторинге распространенности гепатита Е в продуктах убоя свиней в возрасте старше 6 месяцев, где его распространенность составила всего 0,25% [46]. Однако опубликованные данные из других европейских стран показывают высокую распространенность гепатита Е среди продуктов переработки свиной печени. Например, при исследовании, проведенном во Франции, было выявлено 17,3% продуктов, содержащих свиную печень и имеющих положительный результат на гепатит Е

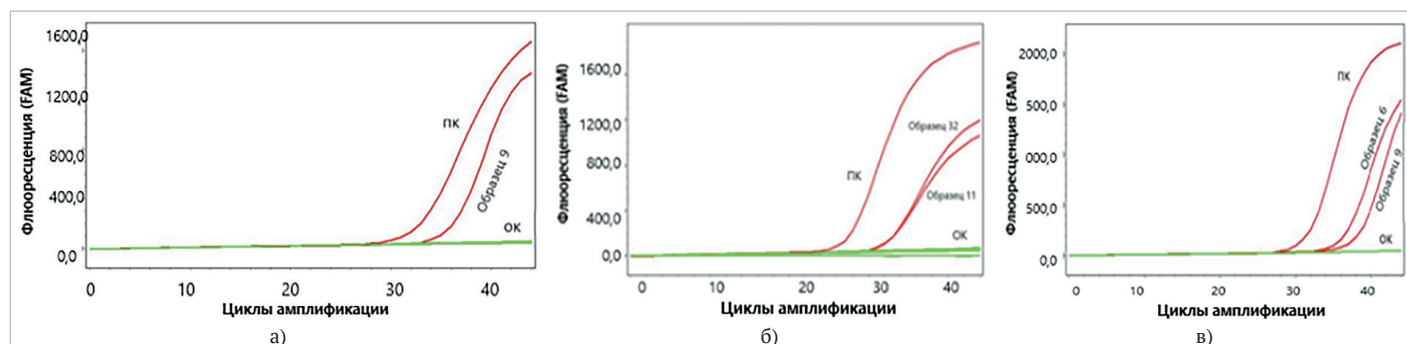


Рисунок 3. Кривые амплификации положительных образцов при исследовании на норовирус GII (ПК – положительный контроль, ОК – отрицательный контроль): а) клубника; б) и в) устрицы
Figure 3. Amplification curves of positive samples upon analysis for norovirus GII (ПК – positive control, ОК — negative control): а) strawberry; б) and в) oysters

[47]. Авторами Di Bartolo с соавторами [48] гепатит Е был обнаружен в сосисках, продаваемых в Испании и Италии, а также в печени и сосисках, продаваемых в Германии [48]. Кроме того, вирус также был выявлен в 59 образцах свиной печени из 345 образцов (17,1%), полученных и протестированных из трех различных округов Сербии [49].

Еще раз подчеркнем, что в отечественных образцах свиной печени вирус гепатита Е обнаружен не был. Возможно, это связано с практикой убоя свиней в возрасте старше 6 месяцев. Согласно литературным данным, наибольший риск присутствия гепатита Е установлен для продуктов убоя свиней младше 6 месяцев [46]. Тем не менее, несмотря на то, что мы не получили положительных результатов по гепатиту Е, мониторинг свиной печени на наличие вируса и других групп пищевых продуктов, имеющих риск контаминации гепатитом Е, целесообразно продолжить для обеспечения безопасности и здоровья людей.

4. Выводы

Проведенные исследования позволили установить эффективность различных подходов к экстракции вирусов из пищевых матриц. Наиболее высокая эффективность (33,35%) наблюдалась при экстракции менговируса из устриц с использованием автоматической станции выделения НК. При этом минимальные значения эффективности экстракции менговируса во всех случаях были выше критического значения (1%), что свидетельствовало о возможности использования исследованных подходов при контроле пищевых продуктов высокого риска. Проведенный мониторинг образцов продуктов показал высокую распространенность норовируса ГII в образцах устриц и клубники — 9,6% и 6,8% соответственно. Таким образом, полученные данные показывают возможность и необходимость постоянного мониторинга распространенности пищевых вирусов в ряде пищевых продуктов, представленных на внутреннем рынке.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Bachofen, C. (2018). Selected viruses detected on and in our food. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 143–153. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0087-9>
- Predmore, A., Li, J. (2011). Enhanced removal of a human norovirus surrogate from fresh vegetables and fruits by a combination of surfactants and sanitizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4829–4838. <https://doi.org/10.1128/AEM.00174-11>
- King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabaraz, D., Fox, E. M. et al. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 68, 160–175. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.014>
- Widén, F., Vågsholm, I., Belák, S., Muradrasoli, S. (2011). Achievement V—Methods for breaking the transmission of pathogens along the food chain: Detection of viruses in food. *Trends in Food Science and Technology*, 22 (Suppl 1), S49–S57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.008>
- Chen, J., Wu, X., Sanchez, G., Randazzo, W. (2020). Viability RT-qPCR to detect potentially infectious enteric viruses on heat-processed berries. *Food Control*, 107, Article 106818. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106818>
- Le Guyader, F. S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K. O., Alsterlund, R., Pommeupuy, M. et al. (2004). Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.018>
- Le Guyader, F. S., Atmar, R. L., Le Pendu, J. (2012). Transmission of viruses through shellfish: When specific ligands come into play. *Current Opinion in Virology*, 2(1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029>
- Yekta, R., Vahid-Dastjerdi, L., Norouzbeigi, S., Mortazavian, A. M. (2021). Food products as potential carriers of SARS-CoV-2. *Food Control*, 123, Article 107754. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107754>
- Djekic, I., Nikolić, A., Uzunović, M., Marijke, A., Liu, A., Han, J. et al. (2021). Covid-19 pandemic effects on food safety — Multi-country survey study. *Food Control*, 122, Article 107800. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107800>
- Miranda, R. C., Schaffner, D. W. (2019). Virus risk in the food supply chain. *Current Opinion in Food Science*, 30, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.002>
- Hrdy, J., Vasickova, P. (2022). Virus detection methods for different kinds of food and water samples—The importance of molecular techniques. *Food Control*, 134, Article 108764. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108764>
- Sun, B., Bosch, A., Myrmel, M. (2019). Extended direct lysis method for virus detection on berries including droplet digital RT-PCR or real time RT-PCR with reduced influence from inhibitors. *Journal of Virological Methods*, 271, Article 115638. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.004>
- Wei, T., Lu, G., Clover, G. (2008). Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. *Journal of Virological Methods*, 151(1), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.003>
- Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R. (2013). Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany. *Food and Environmental Virology*, 5, 162–168. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9118-0>
- Widén, F. (2016). Hepatitis E as a zoonosis. Chapter in a book: *Hepatitis E Virus. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Dordrecht, 2016. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0942-0_4
- Meng, X. J. (2010). Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.017>
- Hamza, I. A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M. (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 424–436. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.07.014>
- Teixeira, P., Costa, S., Brown, B., Silva, S., Rodrigues, R., Valerio, E. (2020). Quantitative PCR detection of enteric viruses in wastewater and environmental water sources by the Lisbon municipality: A case study. *Water*, 12(2), Article 544. <https://doi.org/10.3390/w12020544>
- Farkas, K., Cooper, D. M., McDonald, J. E., Malham, S. K., de Rougemont, A., Jones, D. L. (2018). Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Science of the Total Environment*, 634, 1174–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.038>
- Butot, S., Putallaz, T., Sanchez, G. (2007). Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 186–192. <https://doi.org/10.1128/AEM.01248-06>
- Scherer, K., Johne, R., Schrader, C., Ellerbroek, L., Schulenburg, J., Klein, G. (2010). Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *Journal of Virological Methods*, 169(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.06.008>
- Perrin, A., Loutreul, J., Boudaud, N., Bertrand, I., Gantzer, C. (2015). Rapid, simple and efficient method for detection of viral genomes on raspberries. *Journal of Virological Methods*, 224, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.005>
- Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J. (2008). Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.020>
- Bartsch, C., Szabo, K., Dinh-Thanh, M., Schrader, C., Trojnar, E., Johne, R. (2016). Comparison and optimization of detection methods for noroviruses in frozen strawberries containing different amounts of RT-PCR inhibitors. *Food Microbiology*, 60, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.005>
- Lowther, J. A., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Mäde, D., Rutjes, S. A. et al. (2019). Validation of EN ISO method 15216 — Part 1 — Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 288, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.014>
- Suffredini, E., Magnabosco, C., Civettini, M., Rossetti, E., Arcangeli, G., Croci, L. (2012). Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 686–692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05356.x>
- Gyawali, P., Kc, S., Beale, D. J., Hewitt, J. (2019). Current and emerging technologies for the detection of norovirus from shellfish. *Foods*, 8(6), Article 187. <https://doi.org/10.3390/foods8060187>
- Chung, S. H., Baek, C., Cong, V. T., Min, J. (2015). The microfluidic chip module for the detection of murine norovirus in oysters using charge switchable micro-bead beating. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.083>
- Kingsley, D. H. (2014). High pressure processing of bivalve shellfish and HPP's use as a virus intervention. *Foods*, 3(2), 336–350. <https://doi.org/10.3390/foods3020336>
- Le, H. Q., Suffredini, E., Pham, D. T., To, A. K., Medici, D. D. (2018). Development of a method for direct extraction of viral RNA from bivalve molluscs. *Letters in Applied Microbiology*, 67(5), 426–434. <https://doi.org/10.1111/lam.13065>
- Ambrosi, C., Prezioso, C., Checconi, P., Scribano, D., Sarshar, M., Capannari, M. et al. (2021). SARS-CoV-2: Comparative analysis of different RNA extraction methods. *Journal of Virological Methods*, 287, Article 114008. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114008>
- Griffin, D. W., Donaldson, K. A., Paul, J. H., Rose, J. B. (2003). Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 129–143. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.1.129-143.2003>
- Rajjuddin, S. M., Jensen, T., Hansen, T. B., Schultz, A. C. (2020). An optimised direct lysis method for viral RNA extraction and detection of foodborne viruses on fruits and vegetables. *Food and Environmental Virology*, 12(3), 226–239. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09437-x>
- Hennechart-Collette, C., Dehan, O., Fraise, A., Martin-Latil, S., Perelle, S. (2023). Development of an extraction method to detect hepatitis A Virus, hepatitis E Virus, and noroviruses in fish products. *Microorganisms*, 11(3), Article 624. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030624>
- Greene, S. R., Moe, C. L., Jaykus, L. A., Cronin, M., Grosso, L., van Aarle, P. (2003). Evaluation of the NucliSens basic kit assay for detection of Norwalk virus RNA in stool specimens. *Journal of Virological Methods*, 108(1), 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00286-0)
- Persson, S., Nybögård, L., Simonsson, M., Eriksson, R. (2020). Optimisation and evaluation of an automated system for extraction of viral RNA from oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 315, Article 108386. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108386>
- Steele, M., Lambert, D., Bissonnette, R., Yamamoto, E., Hardie, K., Locas, A. (2022). Norovirus GI and GII and hepatitis A virus in berries and pomegranate arils in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 379, Article 109840. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109840>
- Bernard, H., Faber, M., Wilking, H., Haller, S., Höhle, M., Schielke, A. et al. (2014). Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Eurosurveillance*, 19(8), Article 20719. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.8.20719>

38. Bozkurt, H., Phan-Thien, K.-Y., van Ogtrop, F., Bell, T., McConchie, R. (2021). Outbreaks, occurrence, and control of norovirus and hepatitis A virus contamination in berries: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 116–138. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1719383>
39. Pouillot, R., Smith, M., Van Doren, J. M., Catford, A., Holtzman, J., Calci, K. R. et al. (2022). Risk assessment of norovirus illness from consumption of raw oysters in the United States and in Canada. *Risk Analysis*, 42(2), 344–369. <https://doi.org/10.1111/risa.13755>
40. Dirks, R. A. M., Jansen, C. C. C., Hägele, G., Zwartkruis-Nahuis, A. J. T., Tijssma, A. S. L., Boxman, I. L. A. (2021). Quantitative levels of norovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs collected along the food chain in the Netherlands, 2013–2017. *International Journal of Food Microbiology*, 344, Article 109089. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109089>
41. Gao, X., Wang, Z., Wang, Y., Liu, Z., Guan, X., Ma, Y. et al. (2019). Surveillance of norovirus contamination in commercial fresh/frozen berries from Heilongjiang Province, China, using a TaqMan real-time RT-PCR assay. *Food Microbiology*, 82, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.017>
42. Cook, N., Williams, L., D'Agostino, M. (2019). Prevalence of Norovirus in produce sold at retail in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 79, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.003>
43. Moor, D., Liniger, M., Baumgartner, A., Felleisen, R. (2018). Screening of ready-to-eat meat products for hepatitis E virus in Switzerland. *Food and Environmental Virology*, 10(3), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9340-x>
44. Park, W.-J., Park, B.-J., Ahn, H.-S., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Song, C.-S. et al. (2016). Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *Journal of Veterinary Science*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.1.1>
45. Lainšček, P. R., Toplak, I., Kirbiš, A. (2017). A comprehensive study of hepatitis E virus infection in pigs entering a slaughterhouse in Slovenia. *Veterinary Microbiology*, 212, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.002>
46. Pavio, N., Merbah, T., Thébault, A. (2014). Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1925–1927. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140891>
47. Di Bartolo, I., Angeloni, G., Ponterio, E., Ostanello, F., Ruggeri, F. M. (2015). Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.005>
48. Milojević, L., Velebit, B., Teodorović, V., Kirbiš, A., Petrović, T., Karabasil, N. et al. (2019). Screening and molecular characterization of hepatitis E virus in slaughter pigs in Serbia. *Food and Environmental Virology*, 11(4), 410–419. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09393-1>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Юшина Юлия Константиновна — доктор технических наук, руководитель лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 402) E-mail: yu.yushina@fnpcs.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9265-5511 * автор для контактов	Yuliya K. Yushina, Doctor of Technical Sciences, Head of laboratory of Hygiene of Production and Microbiology, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str. 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (402) E-mail: yu.yushina@fnpcs.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9265-5511 * corresponding author
Семенова Анастасия Артуровна — доктор технических наук, профессор, заместитель директора, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 105) E-mail: a.semenova@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4372-6448	Anastasia A. Semenova, Doctor of Technical Sciences, Professor, Deputy Director, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems. 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (105) E-mail: a.semenova@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4372-6448
Кузнецова Оксана Александровна — доктор технических наук, директор, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 106) E-mail: o.kuznecova@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7474-485X	Oksana A. Kuznecova, Doctor of Technical Sciences, Director, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (106) E-mail: o.kuznecova@fnpcs.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7474-485X
Сатабаева Дагмара Мухмадовна — инженер исследователь, лаборатория «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 405) E-mail: d.satabaeva@fnpcs.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2306-7772	Dagmara M. Satabaeva, Research Engineer, laboratory of Hygiene of Production and Microbiology, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (405) E-mail: d.satabaeva@fnpcs.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-2306-7772
Зайко Елена Викторовна — кандидат технических наук, младший научный сотрудник, лаборатория «Гигиена производства и микробиологии», Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 407) E-mail: e.zaiko@fnpcs.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5048-9321	Elena V. Zaiko, Candidate of Technical Sciences, Junior Research Assistant, Laboratory of Hygiene of Production and Microbiology, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (407) E-mail: e.zaiko@fnpcs.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5048-9321
Велебит Бранко — магистр медицинских наук, главный научный сотрудник, Руководитель отдела микробиологии и молекулярной биологии, Институт гигиены и технологии мяса 11040, Сербия, Белград, ул. Kačanskog, 13 Тел.: +381-11-2650-722 E-mail: branko.velebit@inmes.rs ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7577-8074	Branko Velebit, M. Sc. DVM, Principal Research Fellow, Head of Department of Microbiology and Molecular Biology, Institute of meat hygiene and technology Kačanskog 13, 11040 Belgrade, Serbia Tel.: +381-11-2650-722 E-mail: branko.velebit@inmes.rs ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7577-8074
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-471-476>

Received 02.05.2023

Accepted in revised 18.11.2023

Accepted for publication 23.11.2023

© Kharisma V. D., Ansori A. N.M., Jakhmola V., Ullah E., Purnobasuki H., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

BIOINFORMATICS STUDY OF THE SELECTIVE INHIBITOR FROM *GARCINIA MANGOSTANA* L. TACKLE HIV-1 INFECTION

Viol D. Kharisma^{1,2}, Arif N. M. Ansori^{2,3,4,5}, Vikash Jakhmola⁵, Emdad Ullah⁶, Hery Purnobasuki^{1*}¹ Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia² Computational Virology Research Unit, Division of Molecular Biology and Genetics,

Generasi Biologi Indonesia Foundation, Gresik, Indonesia

³ European Virus Bioinformatics Center, Jena, Germany⁴ Postgraduate School, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia⁵ Uttaranchal Institute of Pharmaceutical Sciences, Uttaranchal University, Dehradun, India⁶ Department of Chemistry, Mississippi State University, Mississippi, United States

KEY WORDS:

antiretroviral,
bioinformatics,
Garcinia mangostana,
HIV-1, protease
inhibitor

ABSTRACT

HIV has a host cell, T-cell lymphocytes with CD4+ receptors. HIV drugs have the inhibitory activity on HIV-1 protease by producing chemical bonding interactions such as hydrogen and hydrophobic. However, some cases show long-term side effects that may be harmful from the use of synthetic antiretrovirals. This requires new innovations to make drugs based on natural resources or alternative medicine for handling these cases. Natural-based drugs are claimed to reduce the side effects produced. *Garcinia mangostana* L. or queen of fruit is widely found in Southeast Asia. Many parts of this plant, such as fruits, are used for traditional medicine. Research with *in vitro* and *in vivo* approaches reveals that mangostin compounds from *Garcinia mangostana* L. can be an antiviral candidate. *Garcinia mangostana* L. has the main chemical compounds of garciniaxanthone, garcinone A, and mangostin. This study uses garciniaxanthone, garcinone A, and mangostin compounds to reveal the molecular mechanism of the antiviral activity in *Garcinia mangostana* L. through inhibition of HIV-1 protease with a bioinformatics approach. *In silico* methods used in this study are druglikeness, molecular docking, interactions, visualization, and dynamic simulation. Garciniaxanthone B, garcinone B, and beta-mangostin from *Garcinia mangostana* L. have potential as antiretroviral agents for the treatment of HIV-1 infection. The three compounds are predicted to inhibit the protease activity in HIV-1 with a more negative binding affinity score, form ligand-protein molecular complexes with van der Waals, hydrogen, pi/alkyl/anion/sigma bonds, form stable bonds and drug-like molecules.

FUNDING: This study is supported by Hibah Riset Mandat (Grant Number: 215/UN3.15/PT/2022) from Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

ACKNOWLEDGEMENTS: This study is supported by the Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia. In addition, we thank Jalan Tengah, Indonesia (<https://jalantengah.site>) for editing the manuscript.

Поступила 02.05.2023

Поступила после рецензирования 18.11.2023

Принята в печать 23.11.2023

© Харишма В. Д., Ансори А. Н.М., Яхмола В., Улла Э., Пурнобасуки Г., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА ИЗ *GARCINIA MANGOSTANA* L. БОРЬБА С ВИЧ-1-ИНФЕКЦИЕЙ

Харишма В. Д.^{1,2}, Ансори А. Н.М.^{2,3,4,5}, Яхмола В.⁵, Улла Э.⁶, Пурнобасуки Г.^{1*}¹ Кафедра биологии, факультет науки и техники, Университет Айрланга, Сурабая, Индонезия² Исследовательский отдел компьютерной вирусологии, отдел молекулярной биологии и генетики, Индонезийский фонд Generasi Biologi, Гресик, Индонезия³ Европейский центр вирусной биоинформатики, Йена, Германия⁴ Департамент Аспирантуры, Университет Айрланга, Сурабая, Индонезия⁵ Уттаранчальский институт фармацевтических наук, Университет Уттаранчал, Дехрадун, Индия⁶ Химический факультет, Университет штата Миссисипи, Миссисипи, США

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

антиретровирусные
препараты,
биоинформатика,
Garcinia mangostana,
ВИЧ-1, ингибитор
протеазы

ВИЧ имеет клетку-хозяина, Т-клеточные лимфоциты с рецепторами CD4+. Препараты против ВИЧ обладают ингибирующей активностью в отношении протеазы ВИЧ-1, создавая химические связи, такие как водородные и гидрофобные. Однако в некоторых случаях наблюдаются долгосрочные побочные эффекты, которые могут быть вредными от использования синтетических антиретровирусных препаратов. Это требует новых инноваций для создания лекарств на основе природных ресурсов или альтернативной медицины для лечения этих случаев. Также утверждается, что лекарства на натуральной основе уменьшают возникающие побочные эффекты. *Garcinia mangostana* L. или королева фруктов широко распространена в Юго-Восточной Азии, многие части этого растения, например плоды, используются в традиционной медицине. Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что соединения мангустина из *Garcinia mangostana* L. могут быть кандидатами на противовирусные препараты. *Garcinia mangostana* L. содержит основные химические соединения гарциниаксанта, гарцинона А и мангостина. В этом исследовании используются соединения гарциниаксанта, гарцинона А и мангустина для выявления молекулярного механизма противовирусной активности *Garcinia mangostana* L. посредством ингибирования протеазы ВИЧ-1 с помощью биоинформатического подхода. Методы *in silico*, используемые в этом исследовании, включают подобие лекарствам, молекулярный докинг, взаимодействия, визуализацию и динамическое моделирование. Гарциниаксантон В, гарцинон В и бета-мангостин из *Garcinia mangostana* L. потенциально могут использоваться в качестве антиретровирусных средств для лечения

FOR CITATION: Kharisma, V.D., Ansori, A.N.M., Jakhmola, V., Ullah, E., Purnobasuki, H. (2023). Bioinformatics study of selective inhibitor from *Garcinia mangostana* L. tackle HIV-1 infection. *Food Systems*, 6(4), 471-476. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-471-476>

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Харишма, В.Д., Ансори, А.Н.М., Яхмола, В., Улла, Э., Пурнобасуки, Г. (2023). Биоинформатическое изучение селективного ингибитора из *Garcinia mangostana* L. Борьба с ВИЧ-1-инфекцией. *Пищевые системы*, 6(4), 471-476. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-471-476>

инфекции ВИЧ-1. Предполагается, что эти три соединения ингибируют протеазную активность ВИЧ-1 с более отрицательным показателем аффинности связывания, образуют молекулярные комплексы лиганд-белок с ван-дер-ваальсовыми, водородными, пи/алкил/анионными/сигма-связями, образуют стабильные связи и подобные лекарствам молекулы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Это исследование поддержано Hibah Riset Mandat (номер гранта: 215/UN3.15/PT/2022) от Университета Айрланга, Сурабая, Индонезия.

БЛАГОДАРНОСТЬ: Это исследование поддержано Университетом Айрланга, Сурабая, Индонезия. Кроме того, мы благодарим Джалана Тенгаха, Индонезия (<https://jalantengah.site>) за редактирование рукописи.

1. Introduction

Garcinia mangostana L. or the queen of fruit is widely found in South-east Asia. Many parts of this plant, such as fruits, are used for traditional medicine. *Garcinia mangostana* L. is a popular plant for alternative medicine found in Asia that contains several chemical compounds such as triterpenoids, flavonoids, and xanthenes. Extracts from this plant can be used in traditional medicine for treatment of several diseases such as diarrhea, infection, dysentery, inflammation, cholera, and fever. Compounds from *Garcinia mangostana* such as α -mangostin have pharmacological effects such as the antioxidant activity [1,2]. *Garcinia mangostana* L. has the main chemical compounds of garciniaxanthone, garcinone A, and mangostin [3,4]. The antiviral activity in other cases was also found through *in vivo* research on the administration of the *Garcinia mangostana* L. extract, which can inhibit the replication of the DENV-2 virus. *In vitro* and *in vivo* studies show that α -mangostin from the *Garcinia mangostana* extract can trigger a significant decrease in viral replication in serum and muscle. Previous research reveals that mangostin compounds from *Garcinia mangostana* L. can be an antiviral candidate against chikungunya virus (CHIKV) infection. The cell model in the study was Vero cells (VC). The results show that mangostin with a concentration of 8 μ M can increase cell viability and reduce virus replication [5]. The antiviral activity of *Garcinia mangostana* L. may be used as an HIV-1 antiviral candidate, as many previous studies revealed.

Human immunodeficiency virus (HIV) consists of two types, HIV-1 and HIV-2 (only found in West Africa). The first cases of HIV-1 infection were identified in 1981 in San Francisco and New York. HIV was found to be a trigger for opportunistic diseases of the immune system or acquired immune deficiency syndrome (AIDS) based on genomic analysis of the virus [6,7]. HIV-2 has a lower prevalence than HIV-1 and is very slow to initiate AIDS in patients. The protease enzymes of HIV-1 are called aspartic proteases used as the main targets for AIDS treatment. Ten years after the discovery of protease (PR) in HIV-1, a drug with a selective antagonist mechanism was discovered in 1987. Then a few months later, a phase 1 clinical trial was conducted on inhibitor candidates such as saquinavir in 1989 (approved in 1995), as well as ritonavir and indinavir. By 2009, around ten protease inhibitor candidates were launched in the market for HIV treatment [8,9]. However, several reports show that long-term side effects, such as nausea, diarrhea, skin rash, etc., can be caused by protease inhibitors from synthetic drugs. In addition, HIV-1 drugs are expensive and cannot be reached by patients with lower economic conditions [10]. This requires new innovations to make drugs based on natural resources or alternative medicine for handling these cases. Natural-based drugs are claimed to reduce the side effects produced.

HIV-1 is a class of retroviruses with RNA-like genetic material. HIV infects T lymphocyte cells with CD4+ representation on the surface. HIV infects host cells requiring a fusion mechanism at the cell membrane. The first stage of replication is the interaction of envelope spike glycoprotein consisting of gp120 and gp41 on host cell receptors (CCR5 & CXCR4) triggering conformational changes in the envelope spike glycoprotein [11,12]. The process produces a hole for the viral capsid to enter the cell. During the entry process several viral enzymes work such as reverse transcriptase to produce cDNA from ssRNA, and integrase for integration of HIV-1 cDNA to form mRNA [13]. The translational process of viral mRNA produces polypeptides, then proteases cut HIV-1 polypeptides into short peptides for the virus assembly. Protease inhibitors act to inhibit the virus assembly process and trigger the failure of the replication process. The inhibitor binds to the functional domain of the enzyme through hydrogen bonding and hydrophobic interactions to produce the inhibitory activity. Hydrogen and hydrophobic bonds play an important role in drug stability in triggering the inhibitory activity on the target. Both bonds play a role in inducing a specific biological response when a ligand-protein complex is formed [14,15]. Candidate inhibitors of HIV-1 proteases must have hydrogen and hydrophobic interactions when binding to functional domains on the target.

Previous research only revealed the potential of *Garcinia mangostana* L. referring to mangostin compounds and the molecular mechanism of compounds-target interaction is not yet known. Bioinformatics can be

used to predict the molecular mechanism of therapeutic effects of drug candidate compounds through bioactivity tests, docking simulations, and molecular dynamics. This study uses garciniaxanthone, garcinone A, and mangostin compounds to reveal the molecular mechanism of the antiviral activity in *Garcinia mangostana* L. through inhibition of HIV-1 protease with a bioinformatics approach.

2. Objects and methods

Garciniaxanthone, garcinone, and mangostin from *Garcinia mangostana* L. consisting of garciniaxanthone A, garciniaxanthone B, garciniaxanthone C, garcinone A, garcinone B, garcinone C, alpha-mangostin, beta-mangostin, and gamma-mangostin as ligands were used in this study. All information on the ligands such as CID, formula, creation, modification, SMILES, and sdf files were obtained from PubChem [16]. Minimization of ligands was performed through OpenBabel v2.3.1 software for conversion of sdf files to pdb and increasing the flexibility of ligand molecules. The target in this study was HIV-1 protease RCSB PDB ID: 1DMP obtained from Protein Databank (PDB; <https://www.rcsb.org>) [17] with pdb file. The removal of water molecules and native ligands on the protein was performed through PyMOL v.2.5.2 software (Schrödinger, Inc., USA) with an academic license to optimize the molecular docking simulation process.

Similarity of physicochemical properties of query compounds with drug molecules in this study was identified through SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) [18] by referring to rules such as Lipinski, Ghose, Veber, Egan, and Muegge. A bioavailability score was used in this study to determine a drug-like molecule. A drug-like molecule is a compound that has similar properties to drug molecules referring to physicochemical properties such as molecular weight, refractivity, number of hydrogen bonds, lipophilicity, and others. Ligands with drug-like molecule properties can circulate in the body, if they have a bioavailability score ≥ 0.5 and trigger specific activity on the target [19,20].

Docking simulation in this study aims to identify the inhibitor activity of garcinoxanthone, mangostin, and garcinone derivatives from *Garcinia mangostana* L. on HIV-1 protease. Docking is an *in silico* method to determine the level of the ligand activity on the target referring to the binding affinity score [21,22]. Determination of the docking grid on HIV-1 protease in this study was as follows: center (Å) X: -13.452 Y: 19.535 Z: 29.487 and dimensions (Å) X: 30.378 Y: 24.648 Z: 31.525; then docking simulation was performed through PyRx v1.0 software (Scripps Research, USA). Ligand-protein molecular complexes from docking simulations are displayed as transparent surfaces, cartoons, and sticks through structural selection in PyMOL v.2.5.2 software (Schrödinger, Inc., USA) with an academic license for standard publication visualization. Protein coloring is a single color and ligand coloring is based on C, H, N, and O atoms [23,24].

Identification of the position and type of chemical bond interactions in the ligand-protein molecular complex was performed through Discovery Studio Visualizer™ v.16.1 software (Dassault Systèmes SE, France). Weak bond interactions, such as van der Waals, hydrogen, electrostatic, hydrophobic, and pi/alkyl bond interactions, were formed in the ligand-protein complex [25,26]. These bonds contribute to affecting the activity and biological response of the target when an interaction with the ligand is formed [27,28].

Stability analysis of chemical bond interactions in ligand-protein interaction hot spots is performed through molecular dynamic simulation on the CABS-flex 2.0 server (<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSflex2>) [29]. This server identifies the stability of ligand-protein molecular complexes by calculating structural flexibility through large-scale conformational simulations. The output score of the simulation results is the root-mean-square fluctuation (RMSF) for the determination of molecular complex stability [29,30].

3. Results and discussion

3.1. Compound and target collection

Garcinia mangostana L. can act as an antiviral candidate based on the results of the *in vitro* and *in vivo* analysis. Previous studies have shown that compounds from these plants can inhibit target virus replication and increase cell viability. *Garcinia mangostana* L. has other benefits such as the

Table 1. Ligand information from the chemical compound database
Таблица 1. Информация о лигандах из базы данных химических соединений

Compound	CID	Formula	Created	Modified	SMILES
Garciniaxanthone A	15293708	C ₂₃ H ₂₄ O ₅	2007-02-09	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C2=C(C=C1) C(=O)C3=C(C(=CC(=C3O2) O)C(C)(C)C=C)O)O)C
Garciniaxanthone B	10407298	C ₂₃ H ₂₂ O ₅	2006-10-25	2022-12-24	CC1(C=CC2=C(O1) C3=C(C=C2) C(=O)C4=C(C(=CC(=C4O3) O)C(C)(C)C=C)O)C
Garciniaxanthone C	9842847	C ₂₃ H ₂₄ O ₅	2006-10-25	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C2=C(C=C1) C(=O)C3=C(C(=CC(=C3O2) O)CC=C(C(C)O)O)C
Garcinone A	70689919	C ₂₃ H ₂₄ O ₅	2013-02-04	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C(=C2C(=C1O)C(=O)C3=C(O2) C=C(C=C3) O)CC=C(C(C)O)C
Garcinone B	5495928	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	2005-08-01	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C2=C(C(=C1O)OC3=C(C2=O)C4=C(C(=C3) O)OC(C=C4)(C)C)O)C
Garcinone C	44159808	C ₂₃ H ₂₆ O ₇	2009-08-24	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C2=C(C(=C1O)OC3=C(C2=O)C(=C(C(=C3) O)O)CCC(C)(C)O)O)C
Alpha-mangostin	5281650	C ₂₄ H ₂₆ O ₆	2005-03-26	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C2=C(C(=C1O)OC3=C(C2=O)C(=C(C(=C3) O)OC)CC=C(C(C)O)C
Beta-mangostin	5495925	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	2005-08-01	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C(=C2C(=C1O)C(=O)C3=C(O2) C=C(C(=C3CC=C(C)C)OC)O)OC)C
Gamma-mangostin	5464078	C ₂₃ H ₂₄ O ₆	2005-08-01	2022-12-24	CC(=CCC1=C(C2=C(C(=C1O)OC3=C(C2=O)C(=C(C(=C3) O)O)CC=C(C(C)O)C

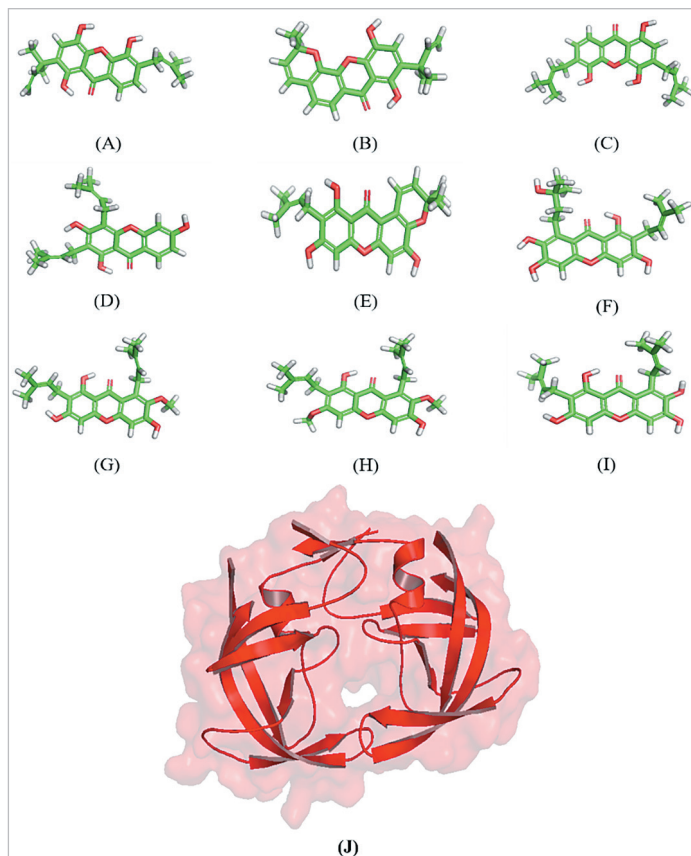


Figure 1. Structural visualization of ligands and target.

(A) garciniaxanthone A, (B) garciniaxanthone B, (C) garciniaxanthone C, (D) garcinone A, (E) garcinone B, (F) garcinone C, (G) alpha-mangostin, (H) beta-mangostin, (I) gamma-mangostin, and (J) HIV-1 protease

Рисунок 1. Структурная визуализация лигандов и цели.

(A) гарциниаксантаон А, (B) гарциниаксантаон В, (C) гарциниаксантаон С, (D) гарцинон А, (E) гарцинон В, (F) гарцинон С, (G) альфа-мангостин, (H) бета-мангостин, (I) гамма-мангостин и (J) протеаза ВИЧ-1

anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic, and antimicrobial activities [31–33]. Screening of natural compounds-based HIV-1 antiviral candidates through the computational approach is important in this study for the discovery of new treatment alternatives and prediction of molecular mechanisms of antiviral compounds from *Garcinia mangostana* L. Chemical compounds of garciniaxanthone, garcinone, and mangostin derivatives from *Garcinia mangostana* L. with information on compound name, CID, formula, creation, modification, SMILES, and sdf file were obtained from the database (Table 1). The 3D visualization of ligands was performed with the display of sticks and transparent cartoons on the target (Figure 1).

3.2. Drug-like compounds

The similarity of query ligands with drug molecules in terms of several druglikeness rules such as Lipinski, Ghose, Veber, Egan, and Muegge was analyzed with Canonical SMILES input from garcinoxanthone, mangostin, and garcinone derivative compounds [34–36]. The results of the druglikeness analysis show that all query compounds from *Garcinia mangostana* L.

are probable drug-like molecules because they fulfill at least 3 druglikeness rules such as Lipinski, Ghose, Veber, and Egan. All query compounds have a bioavailability score of 0.55 (Table 2). The query compound can have activity similar to drug molecules and can circulate in the body of *Homo sapiens* because it has a bioavailability score of ≥ 0.5 . The query is also predicted to pass through selectively permeable membranes to the target in cells [37].

Table 2. The result of drug-like molecule prediction

Таблица 2. Результат прогнозирования подобных лекарствам молекул

Compound	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Bioavailability score	Probable
Garciniaxanthone A	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule
Garciniaxanthone B	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule
Garciniaxanthone C	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule
Garcinone A	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule
Garcinone B	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule
Garcinone C	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55	Drug-like molecule
Alpha-mangostin	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule
Beta-mangostin	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule
Gamma-mangostin	Yes	Yes	Yes	Yes	No	0.55	Drug-like molecule

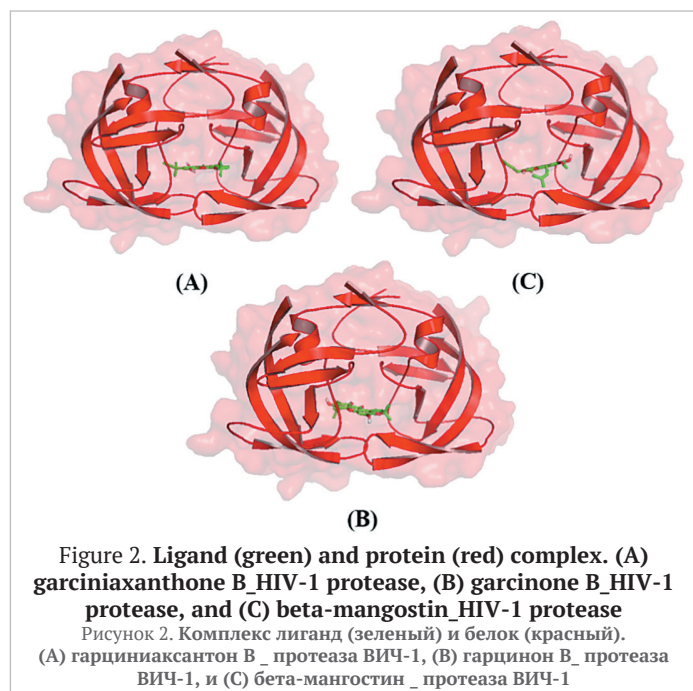
3.3. Molecular interaction between the HIV-1 protease and query compound

Simulation of ligand-protein molecular interactions in this study was performed through the docking method with grid position: center (Å) X: -13.452 Y: 19.535 Z: 29.487 and dimensions (Å) X: 30.378 Y: 24.648 Z: 31.525 on HIV-1 protease. Molecular docking aims to screen the ligand activity on the target with reference to the binding affinity score [38]. Binding affinity is a negative free energy from the result of ligand-protein complex interaction that works according to the law of thermodynamics [39,40]. This is also proportional to the increase in the inhibitor activity on the target by ligands with more negative binding affinity scores. Docking simulation results show that garciniaxanthone B (-9.3 kcal/mol), garcinone B (-9.4 kcal/mol), and beta-mangostin (-9.3 kcal/mol) have more negative binding affinity scores than other derivative compounds (Table 3). This indicates that the three compounds from *Garcinia mangostana* L. have the potential to be good HIV-1 protease inhibitor candidates. The 3D visualization of ligand-protein complexes from docking results is displayed with the structure of transparent surfaces, cartoons, sticks, and single-color selection (Figure 2).

Table 3. Comparison of binding affinity scores

Таблица 3. Сравнение баллов аффинности связывания

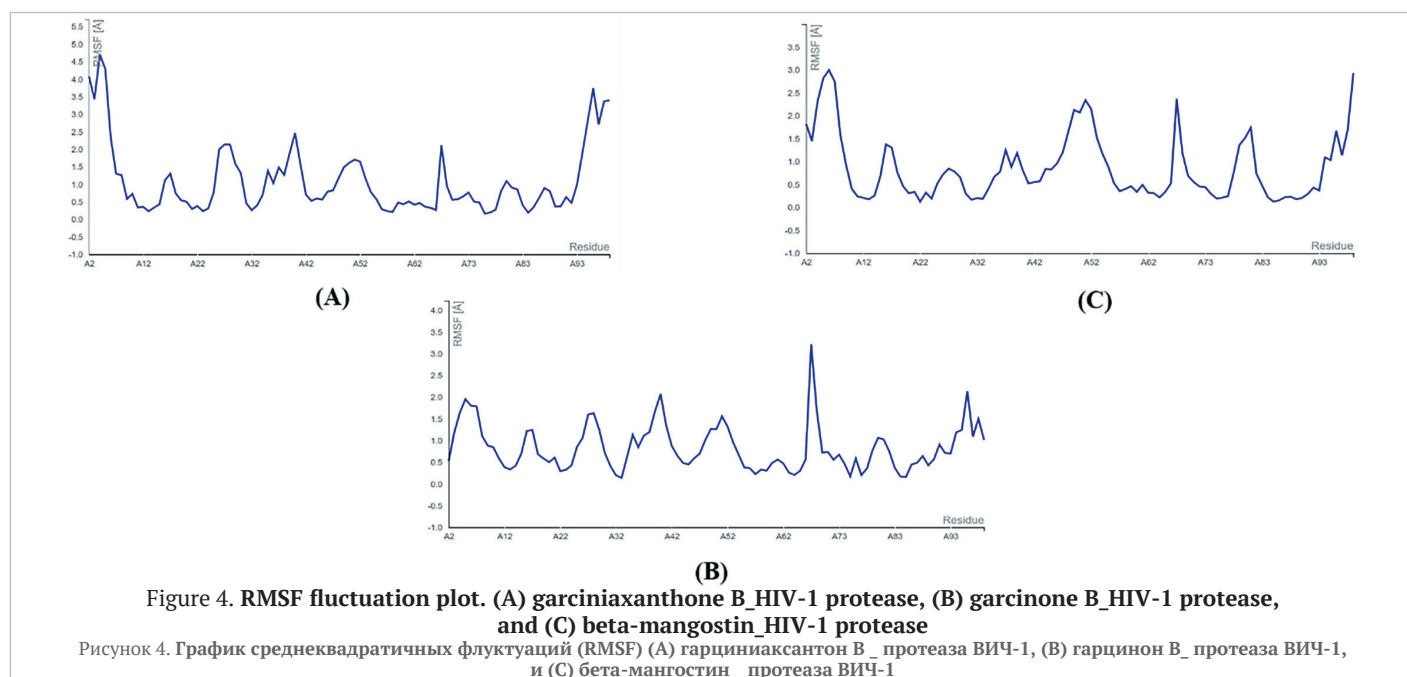
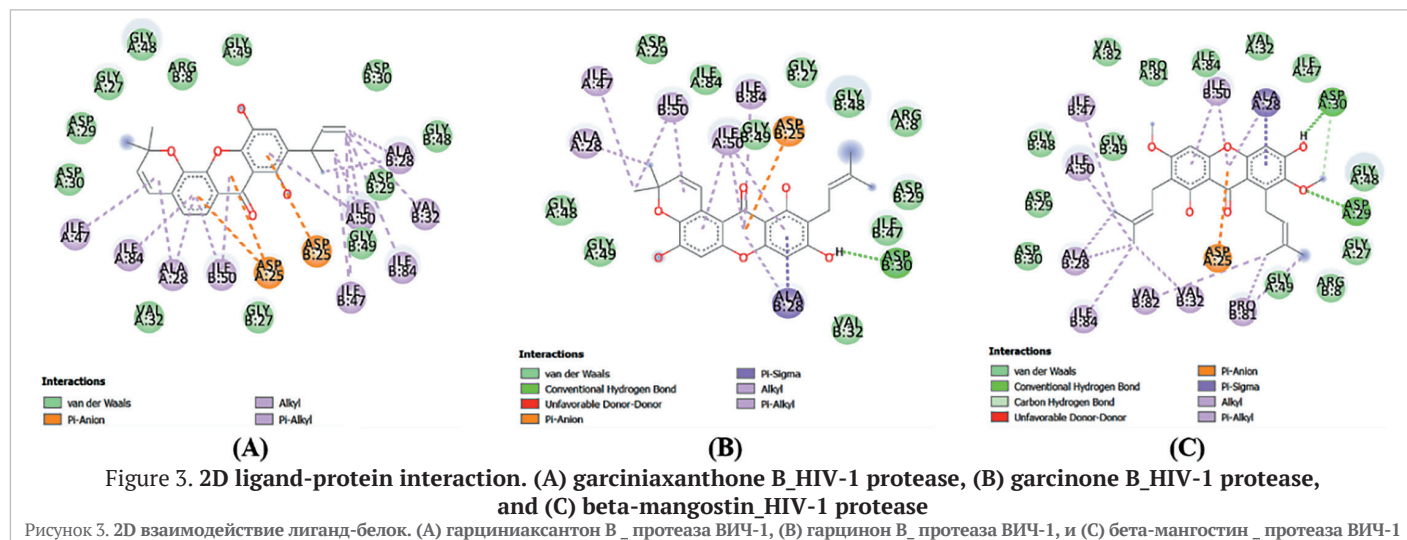
Compound	CID	Target	PDB ID	Binding affinity (kcal/mol)
Garciniaxanthone A	15293708	HIV-1 protease	1DMP	-8.9
Garciniaxanthone B	10407298	HIV-1 protease	1DMP	<u>-9.3</u>
Garciniaxanthone C	9842847	HIV-1 protease	1DMP	-9.1
Garcinone A	70689919	HIV-1 protease	1DMP	-8.8
Garcinone B	5495928	HIV-1 protease	1DMP	<u>-9.4</u>
Garcinone C	44159808	HIV-1 protease	1DMP	-8.5
Alpha-mangostin	5281650	HIV-1 protease	1DMP	-8.7
Beta-mangostin	5495925	HIV-1 protease	1DMP	<u>-9.3</u>
Gamma-mangostin	5464078	HIV-1 protease	1DMP	-8.7



Garciniaxanthone B interacts with HIV-1 protease hotspots namely Gly49, Arg8, Gly48, Gly27, Asp29, Asp30, Val32, Gly27, Gly49, Asp29, Gly48, and Asp30 via van der Waals bond, Ile47, Ile84, Ala28, Ile50, Asp25, Ile47, Ile84, Ile50, Val32, and Ala28 via Pi/Alkyl/Anion bond with 0 unfavorable. Garcinone B interacted at the HIV-1 protease hotspot through Asp29, Ile84, Gly49, Gly27, Gly48, Arg8, Asp29, Ile47, Val32, Gly49, Gly48 with van der Waals bond, hydrogen bond identified at Asp30, and Pi/Alkyl/Sigma/Anion at Ala28, Ile47, Ile50, Ile84, and Ala28 with 1 unfavorable. Beta-mangostin interacted at the HIV-1 protease hotspot through Val82, Pro81, Ile84, Val32, Ile47, Gly48, Gly27, Arg8, Gly49, Asp30, Asp29, Gly48, and Gly49 with van der Waals bond, hydrogen bond at Asp30 and Asp29, Pi/Alkyl/Sigma/Anion bond identified at Ile47, Ile50, Ala28, Ile84, Val82, Val32, Pro81, Asp25 (Figure 3). Weak interactions such as hydrogen, van der Waals, hydrophobic, pi, alkyl, electrostatic, and hydrophobic can trigger the ligand activity on targets such as inhibitors [41,42]. Unfavorable bonds can trigger unstable ligand-protein if > 3 [43,44]. Garciniaxanthone B, garcinone B, and beta-mangostin can affect the inhibitor activity on the target because they produce weak bonds such as van der Waals, hydrogen, and pi/alkyl/anion/sigma with a number of unfavorable interactions (not more than three).

3.4. Interaction stability

Identification of the chemical bond stability at interaction hotspots in this study was carried out through molecular dynamics simulations. The ligand-protein complexes of garciniaxanthone B_HIV-1 protease, garcinone B_HIV-1 protease, and beta-mangostin_HIV-1 protease (Figure 4) was identified as having RMSF values > 3 (Å). Ligand-protein



complexes with RMSF values >3 at interaction hotspots show stable properties and may trigger the inhibitory activity on the target [45–47]. RMSF shows the fluctuation of atoms that form amino acid residues in an active protein. The molecular stability of the results of this study refers to the ligand's activity on the target as a good inhibitor [48–50]. However, this computational prediction requires further analysis through *in vivo* and *in vitro* approaches.

4. Conclusion

In summary, garciniaxanthone B, garcinone B, and beta-mangostin from *Garcinia mangostana* L. have potential as antiretroviral agents for the treatment of HIV-1 infection. The three compounds are predicted to inhibit the protease activity in HIV-1 with a more negative binding affinity score, form ligand-protein molecular complexes with van der Waals, hydrogen, pi/alkyl/anion/sigma bonds, form stable bonds and drug-like molecules.

REFERENCES/ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Arnawati, I. A., Sudiana, I. K. (2022). Formation of woven bone in orthodontic tooth movement tension areas after giving Mangostin by expression of Runx-2 and IL-10. *Bali Medical Journal*, 11(3), 1956–1962. <https://doi.org/10.15562/bmj.v11i3.3971>
2. Pramana, T. Y., Wasita, B., Widyaningsih, V., Cilmiaty, R., Suroto, S., Mudigdo, A. et al. (2021). The ethanol extract of *Garcinia mangostana* L peel reduces the isoniazid-induced liver damage in rats. *Bali Medical Journal*, 10(1), 156–159. <https://doi.org/10.15562/bmj.v10i1.2108>
3. Indharty, R. S., Japardi, I., Siahaan, A. M., Tandean, S. (2019). Mangosteen extract reduce apoptosis via inhibition of oxidative process in rat model of traumatic brain injury. *Bali Medical Journal*, 8(1), 227–232. <https://doi.org/10.15562/bmj.v8i1.1153>
4. Handayani, Wulandari, D. D., Wulansari, D. D. (2022). Phytochemical screening, antioxidant activity and cytotoxicity assay from noni juice and fermented noni (*Morinda citrifolia* L.). *Bali Medical Journal*, 11(3), 1168–1171. <https://doi.org/10.15562/bmj.v11i3.3534>
5. Patil, P., Agrawal, M., Almelkar, S., Jeengar, M. K., More, A., Alagarasu, K. et al. (2021). *In vitro* and *in vivo* studies reveal a-xanthone, a xanthone from *Garcinia mangostana*, as a promising natural antiviral compound against chikungunya virus. *Virology Journal*, 18(1), Article 47. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01517-z>
6. Sharp, P. M., Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), Article a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
7. de Cock, K. M., Jaffe, H. W., Curran, J. W. (2011). Reflections on 30 years of AIDS. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), 1044–1048. <https://doi.org/10.3201/eid1706.100184>
8. Rhame, F. S., Rawlins, S. L., Petruschke, R. A., Erb, T. A., Winchell, G. A., Wilson, H. M. et al. (2004). Pharmacokinetics of indinavir and ritonavir administered at 667 and 100 milligrams, respectively, every 12 hours compared with indinavir administered at 800 milligrams every 8 hours in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4200–4208. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4200-4208.2004>
9. Prianggandani, M. A. V., Lestari, A. A. W., Wande, I. N., Mahartini, N. N., Herawati, S. (2023). Correlation between T-lymphocyte CD4+ and total lymphocyte count (TLC), hemoglobin, neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and T-lymphocyte CD4+/CD8+ ratio in HIV patients at Prof. Dr. I.G.N.G Ngoerah Hospital, Denpasar, Bali, Indonesia. *Bali Medical Journal*, 12(2), 2017–2021. <https://doi.org/10.15562/bmj.v12i2.4342>
10. Hadiatma, F. N., Triyono, E. A. (2023). A naive human immunodeficiency virus (HIV) patient with extrapulmonary tuberculosis manifestation: Diagnosis and management challenges. *Bali Medical Journal*, 12(1), 319–323. <https://doi.org/10.15562/bmj.v12i1.4061>
11. Iwase, S. C., Miyazato, P., Katsuya, H., Islam, S., Yang, B. T. J., Ito, J. et al. (2019). HIV-1 DNA-capture-seq is a useful tool for the comprehensive characterization of HIV-1 provirus. *Scientific Reports*, 9(1), Article 12326. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48681-5>
12. Satou, Y., Katsuya, H., Fukuda, A., Misawa, N., Ito, J., Uchiyama, Y. et al. (2018). Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model. *Scientific Reports*, 8(1), Article 6770. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24607-5>
13. Aso, H., Nagaoka, S., Kawakami, E., Ito, J., Islam, S., Tan, B. J. Y. et al. (2020). Multiomics investigation revealing the characteristics of HIV-1-infected cells *in vivo*. *Cell Reports*, 32(2), Article 107887. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107887>
14. Badaya, A., Sasidhar, Y. U. (2020). Inhibition of the activity of HIV-1 protease through antibody binding and mutations probed by molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 10(1), Article 5501. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62423-y>
15. Matsuda, K., Islam, S., Takada, T., Tsuchiya, K., Yang Tan, B. J., Hattori, S.-I. et al. (2021). A widely distributed HIV-1 provirus elimination assay to evaluate latency-reversing agents *in vitro*. *Cell Reports Methods*, 1(8), Article 100122. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100122>
16. Kim, S. (2021). Exploring chemical information in PubChem. *Current Protocols*, 1(8), Article e217. <https://doi.org/10.1002/cpz1.217>
17. Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichton, G. V., Christie, C. H. et al. (2021). RCSB Protein Data Bank: Powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D437–D451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>
18. Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, Article 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
19. Ononmadu, C. J., Ibrahim, A. (2021). Molecular docking and prediction of ADME/drug-likeness properties of potentially active antidiabetic compounds isolated from aqueous-methanol extracts of *Gymnema sylvestre* and *Combretum micranthum*. *Biotechnology*, 102(1), 85–99. <https://doi.org/10.5114/bta.2021.103765>
20. Yadav, R., Imran, M., Dhamija, P., Chaurasia, D. K., Handu, S. (2021). Virtual screening, ADMET prediction and dynamics simulation of potential compounds targeting the main protease of SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(17), 6617–6632. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796812>
21. Mithilesh, S., Raghunandan, D., Suresh, P. K. (2022). *In-silico* identification of natural compounds from traditional medicine as potential drug leads against SARS-CoV-2 through virtual screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 92(1), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s40011-021-01292-5>
22. Khan, S., Nasrullah, Hussain, A., Asif, M., Sattar, F. A., Audhal, F. A. et al. (2023). *In-silico* studies of inhibitory compounds against protease enzymes of SARS-CoV-2. *Medicine*, 102(6), Article e31318. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000031318>
23. Rosignoli, S., Paiardini, A. (2022). Boosting the full potential of PyMOL with structural biology plugins. *Biomolecules*, 12(12), Article 1764. <https://doi.org/10.3390/biom12121764>
24. Choudhary, S., Kesavan, A. K., Juneja, V., Thakur, S. (2023). Molecular modeling, simulation and docking of Rv1250 protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioinformatics*, 3, Article 1125479. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1125479>
25. Khan, S. A., Wu, Y., Li, A. S.-M., Fu, X.-Q., Yu, Z.-L. (2022). Network pharmacology and molecular docking-based prediction of active compounds and mechanisms of action of *Cnidii fructus* in treating atopic dermatitis. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), Article 275. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03734-7>
26. Nada, H., Elkamhaw, A., Lee, K. (2022). Identification of 1H-purine-2,6-dione derivative as a potential SARS-CoV-2 main protease inhibitor: Molecular docking, dynamic simulations, and energy calculations. *PeerJ*, 10, Article e14120. <https://doi.org/10.7717/peerj.14120>
27. Gurung, A. B., Ali, M. A., Elshikh, M. S., Aref, I., Amina, M., Lee, J. (2022). An *in silico* approach unveils the potential of antiviral compounds in preclinical and clinical trials as SARS-CoV-2 omicron inhibitors. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(6), Article 103297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103297>
28. Terefe, E. M., Ghosh, A. (2022). Molecular docking, validation, dynamics simulations, and pharmacokinetic prediction of phytochemicals isolated from *Croton dichogamus* against the HIV-1 reverse transcriptase. *Bioinformatics and Biology Insights*, 16, Article 11779322221125605. <https://doi.org/10.1177/11779322221125605>
29. Verkhivker, G. (2022). Conformational flexibility and local frustration in the functional states of the SARS-CoV-2 spike B.1.1.7 and B.1.351 variants: Mutation-induced allosteric modulation mechanism of functional dynamics and protein stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), Article 1646. <https://doi.org/10.3390/ijms23031646>
30. Sumera, Anwer, F., Waseem, M., Fatima, A., Malik, N., Ali, A. et al. (2022). Molecular docking and molecular dynamics studies reveal secretory proteins as novel targets of temozolomide in glioblastoma multiforme. *Molecules*, 27(21), Article 7198. <https://doi.org/10.3390/molecules27217198>
31. Puławski, W., Koliński, A., Koliński, M. (2023). Integrative modeling of diverse protein-peptide systems using CABS-dock. *PLoS Computational Biology*, 19(7), Article e1011275. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011275>
32. Umar, A. K., Zothantluanga, J. H., Luckanagul, J. A., Limpikirati, P., Sriwidodo, S. (2023). Structure-based computational screening of 470 natural quercetin derivatives for identification of SARS-CoV-2 Mpro inhibitor. *PeerJ*, 11, Article e14915. <https://doi.org/10.7717/peerj.14915>
33. Bi, C., Xu, H., Yu, J., Ding, Z., Liu, Z. (2023). Botanical characteristics, chemical components, biological activity, and potential applications of mangosteen. *PeerJ*, 11, Article e15329. <https://doi.org/10.7717/peerj.15329>
34. Zonouz, A. M., Rahbardo, M., G. Hosseinzadeh, H. (2023). Antidotal and protective effects of mangosteen (*Garcinia mangostana*) against natural and chemical toxicities: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 26(5), 492–503. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.66900.14674>
35. Suksamran, N., Anantawat, V., Wattanaarsakit, P., Wei, C., Rahman, M. A., Majima, H. J. et al. (2022). Mangosteen vinegar from *Garcinia mangostana*: quality improvement and antioxidant properties. *Heliyon*, 8(12), Article e11943. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11943>
36. Khan, I., Zaib, S. (2023). Designing next-generation drug-like molecules for medicinal applications. *Molecules*, 28(4), Article 1860. <https://doi.org/10.3390/molecules28041860>
37. Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 3, 3.1.1–3.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>
38. Tiz, D. B., Bagnoli, L., Rosati, O., Marini, F., Santi, C., Sancineto, L. (2022). FDA-approved small molecules in 2022: Clinical uses and their synthesis. *Pharmaceutics*, 14(11), Article 2538. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112538>
39. McMillan, A. E., Wu, W. W. X., Nichols, P. L., Wanner, B. M., Bode, J. W. (2022). A vending machine for drug-like molecules — automated synthesis of virtual screening hits. *Chemical Science*, 13(48), 14292–14299. <https://doi.org/10.1039/d2sc05182f>
40. Tungary, E., Ongko, J., Sukweenadhi, J., Antonius, Y. (2022). Molecular docking of active compounds from traditional medicinal plants as ACE-2 protein (1R4L) inhibitor in searching for COVID-19 drug. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(9), 4235. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2022.00712>
41. Krihariyani, D., Haryanto, E., Sasongkowati, R. (2021). *In silico* analysis of antiviral activity and pharmacokinetic prediction of Brazilain Sappan Wood (*Caesalpinia sappan* L.) against SARS-CoV-2 spike glycoproteins. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 3(1), 26–37. <https://doi.org/10.33086/ijmlst.v3i1.1854>

42. Medina-Barandica, J., Contreras-Puentes, N., Tarón-Dunoyer, A., Durán-Lengua, M., Alviz-Amador, A. (2023). *In-silico* study for the identification of potential destabilizers between the spike protein of SARS-CoV-2 and human ACE-2. *Informatics in Medicine Unlocked*, 40, Article 101278. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2023.101278>
43. Macalalad, M. A. B., Gonzales, A. A. (2023). *In silico* screening and identification of antidiabetic inhibitors sourced from phytochemicals of philippine plants against four protein targets of diabetes (PTP1B, DPP-4, SGLT-2, and FBPase). *Molecules*, 28(14), Article 5301. <https://doi.org/10.3390/molecules28145301>
44. Julaton, T., Tacendo, A., Oyong, G., Rempillo, O., Galvez, M. C., Vallar, E. (2022). *In silico* insights on the pro-inflammatory potential of polycyclic aromatic hydrocarbons and the prospective anti-inflammatory capacity of *Andrographis paniculata* phytochemicals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(14), Article 8588. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148588>
45. Nag, A., Dasgupta, A., Sengupta, S., Lai, T. K., Acharya, K. (2023). An in-silico pharmacophore-based molecular docking study to evaluate the inhibitory potentials of novel fungal triterpenoid Astrakurkurone analogues against a hypothetical mutated main protease of SARS-CoV-2 virus. *Computers in Biology and Medicine*, 152, Article 106433. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2022.106433>
46. Yang, S.-Q., Zhang, L.-X., Ge, Y.-J., Zhang, J.-W., Hu, J.-X., Shen, C.-Y. et al. (2023). *In-silico* target prediction by ensemble chemogenomic model based on multi-scale information of chemical structures and protein sequences. *Journal of Cheminformatics*, 15(1), Article 48. <https://doi.org/10.1186/s13321-023-00720-0>
47. Saraswat, J., Riaz, U., Patel, R. (2022). *In-silico* study for the screening and preparation of ionic liquid-AVDs conjugate to combat COVID-19 surge. *Journal of Molecular Liquids*, 359, Article 119277. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119277>
48. Cabral, M. B., Cruz, C. J. D., Sato, Y., Oyong, G., Rempillo, O., Galvez, M. C. et al. (2022). *In Silico* approach in the evaluation of pro-inflammatory potential of polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile organic compounds through binding affinity to the human toll-like receptor 4. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(14), Article 8360. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148360>
49. Begum, M. N., Mahtarin, R., Ahmed, S., Shahriar, I., Hossain, S. R., Mia, M. W. et al. (2023). Investigation of the impact of nonsynonymous mutations on thyroid peroxidase dimer. *PloS One*, 18(9), Article e0291386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291386>
50. Naha, A., Banerjee, S., Debroy, R., Basu, S., Ashok, G., Priyamvada, P. et al. (2022). Network metrics, structural dynamics and density functional theory calculations identified a novel Ursodeoxycholic Acid derivative against therapeutic target Parkin for Parkinson's disease. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 4271–4287. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.017>

AUTHOR INFORMATION		СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	
Affiliation		Принадлежность к организации	
Viol D. Kharisma , Master of Science, PhD Student, Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo, Kec. Mulyorejo, Surabaya, East Java, 60115, Indonesia Tel.: +628–121–78–70–02 E-mail: viol.dhea.kharisma-2022@fst.unair.ac.id ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9060-0429		Харишма Виол Дхеа — магистр наук, аспирант, кафедра биологии, факультет науки и техники, Университет Айрланга 60115, Индонезия, Восточная Ява, Сурабая, округ Мулиорехо Тел.: +628–121–78–70–02 E-mail: viol.dhea.kharisma-2022@fst.unair.ac.id ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9060-0429	
Arif N. M. Ansori , PhD in Veterinary Science, Researcher, Postgraduate School, Universitas Airlangga Jl. Airlangga 4–6, Surabaya, East Java, 60286, Indonesia Tel.: +628–214–464–78–32 E-mail: ansori.anm@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1279-3904		Анзори Ариф Нур Мухаммад — PhD, Доктор ветеринарных наук, научный сотрудник, департамент аспирантуры, Университет Айрланга 60115, Индонезия, Восточная Ява, Сурабая, округ Мулиорехо, ул. Мулиорехо Тел.: +628–214–464–78–32 E-mail: ansori.anm@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1279-3904	
Vikash Jakhmola , Professor, Professor, Uttaranchal Institute of Pharmaceutical Sciences, Uttaranchal University Chakrata Rd, Prem Nagar, Dehradun, Uttarakhand, 248007, India Tel.: +918–126–00–96–20 E-mail: jakhmola.1979@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8108-006X		Яхмола Викаш — профессор, Уттаранчальский институт фармацевтических наук, Уттаранчальский университет 248007, Индия, Уттаракханд, Дехрадун, ул. Чакрата Тел.: +918–126–00–96–20 E-mail: jakhmola.1979@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8108-006X	
Emdad Ullah , Master of Science, PhD Student, Department of Chemistry, Mississippi State University 310 President Cir, Mississippi, Mississippi State, United States MS39762 Tel.: +1–662–617–56–70 E-mail: emdadsami@yahoo.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1683-2501		Улла Эмдат — магистр наук, аспирант, химический факультет, Университет штата Миссисипи MS39762, США, штат Миссисипи, Миссисипи, Президентский центр, 310 Тел.: +1–662–617–56–70 E-mail: emdadsami@yahoo.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1683-2501	
Hery Purnobasuki , Professor, Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo, Kec. Mulyorejo, Surabaya, East Java, 60115, Indonesia Tel.: +6–231–592–68–04 E-mail: hery-p@fst.unair.ac.id ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0562-2058 * corresponding author		Гери Пурнобасуки , профессор, кафедра биологии, факультет науки и техники, Университет Айрланга 60115, Индонезия, Восточная Ява, Сурабая, округ Мулиорехо, ул. Мулиорехо Тел.: +6–231–592–68–04 E-mail: hery-p@fst.unair.ac.id ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0562-2058 * автор для контактов	
Contribution		Критерии авторства	
Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.		Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	
Conflict of interest		Конфликт интересов	
The authors declare no conflict of interest.		Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-477-487>



Received 17.08.2023

Accepted for revised 16.11.2023

Accepted for publication 21.11.2023

© Myagkonosov D. S., Abramov D. V., Delitskaya I. N., Bukcharina G. B., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

INFLUENCE OF DIFFERENT MILK-CLOTTING ENZYMES ON THE QUALITY AND SHELF LIFE OF SEMI-HARD CHEESES

Dmitriy S. Myagkonosov,* Dmitriy V. Abramov, Irina N. Delitskaya, Galina B. Bukcharina

All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking, Uglich, Yaroslavl Region, Russia

KEY WORDS:

semihard cheese, milk-clotting enzymes, chymosin, pepsin, microbial coagulant, proteolysis, bitter taste, rheology, microstructure

ABSTRACT

The study examined semi-hard cheeses made with milk-clotting enzymes (MCEs) of animal origin (Naturen Extra with a mass fraction of chymosin 95%, "Bovine Pepsin" with a mass fraction of chymosin 10%), microbial origin (Fromase 750 XLG) and recombinant origin (Chy-max Extra and Chy-max Supreme), at an introduction dose of MCE of 1,500 to 6,000 IMCU per 100 kg of milk. In cheeses at the age of 7, 60, and 150 days, pH, the degree of proteolysis, the content of peptides with a mass of 1–5 kDa, and the compressive stress at fracture were determined. Cheeses produced with a dose of MCE of 5,000–6,000 IMCU/100 kg of milk had a substantially ($p < 0.05$) lower pH compared to cheeses made with doses of MCEs of 1,500–3,000 IMCU/100 kg of milk. At the same time points, there were no significant differences ($p > 0.05$) in the degree of proteolysis between cheeses made using diverse types of MCEs at the same dose. The exceptions were cheeses produced with Chy-max Supreme, which had a substantially ($p < 0.05$) lower level of proteolysis. Sensory assessment of the bitter taste intensity in cheeses is proportional to the content of peptides with a molecular weight of 1–5 kDa. With an increase in the MCE dose, the content of peptides with a molecular weight of 1 to 5 kDa increases in cheese. Chy-max Supreme forms the least number of bitter peptides in cheeses ($p < 0.05$). There are no significant differences ($p < 0.05$) in the magnitude of the compressive stress at fracture between the cheese variants produced with the same MCE doses of diverse types at the same time points.

FUNDING: The article was prepared as part of the research under the state assignment No. FNEN-2019-0010 of the V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences.

Поступила 17.08.2023

Поступила после рецензирования 16.11.2023

Принята в печать 21.11.2023

© Мягконосов Д. С., Абрамов Д. В., Делицкая И. Н., Бухарина Г. Б., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ НА КАЧЕСТВО И СРОКИ ХРАНЕНИЯ ПОЛУТВЕРДЫХ СЫРОВ

Мягконосов Д. С.*, Абрамов Д. В., Делицкая И. Н., Бухарина Г. Б.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, Углич, Ярославская область, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

полутвердые сыры, молокоосвертывающие ферменты, химозин, пепсин, микробный коагулянт, протеолиз, горький вкус, реология, микроструктура

Исследовали полутвердые сыры изготовленные с молокоосвертывающими ферментами (МФ) животного происхождения (Naturen Extra с массовой долей химозина 95%, «Говяжий пепсин» с массовой долей химозина 10%), микробного происхождения (Fromase 750 XLG) и рекомбинантного происхождения (Chy-max Extra и Chy-max Supreme), при дозе внесения МФ от 1 500 до 6 000 IMCU на 100 кг молока. В сырах в возрасте 7, 60 и 150 сут определяли pH, степень протеолиза, содержание пептидов с массой 1–5 кДа, напряжение сжатия при разрушении. Сыры, изготовленные с дозой МФ 5 000–6 000 IMCU/100 кг молока, имели достоверно ($p < 0,05$) более низкий уровень pH в сравнении с сырами, произведёнными с дозами МФ 1 500–3 000 IMCU/100 кг молока. В одинаковые моменты времени, отсутствовали достоверные отличия ($p > 0,05$) по степени протеолиза между сырами, изготовленными с использованием МФ разного типа в одинаковой дозе. Исключением были сыры, изготовленные с МФ Chy-max Supreme, в которые имели достоверно ($p < 0,05$) более низкий уровень протеолиза. Сенсорная оценка интенсивности горького вкуса в сырах пропорциональна содержанию в них пептидов с молекулярной массой 1–5 кДа. При повышении дозы внесения МФ, в сырах повышается содержание пептидов с молекулярной массой от 1 до 5 кДа. МФ Chy-max Supreme образует в сырах наименьшее количество горьких пептидов ($p < 0,05$). Отсутствуют достоверные отличия ($p < 0,05$) по величине напряжения сжатия при разрушении между вариантами сыров выработанных с одинаковыми дозами МФ разных типов в одинаковые моменты времени.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FNEN-2019-0010 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова.

1. Introduction

Semi-hard cheeses are quite expensive, and keeping their quality for a long time is a critical issue. The reasons limiting the shelf life of semi-hard cheeses include proteolysis of cheese mass proteins.

Milk-clotting enzyme (MCE) is used as an essential component in the production of semi-hard cheeses. Part of the MCE added to milk passes into the composition of the cheese curd, where it retains its activity throughout the entire period of cheese maturation and storage [1,2]. MCE penetrates casein micelles and slowly hydrolyzes casein molecules into large peptides [3]. Under the action of proteolysis, the casein net, which makes up the power frame of the cheese, weakens, and

the texture of the cheese softens. The cleavage of polypeptide bonds is an important part of the ripening process of semi-hard cheeses, leading to the transformation of the cheese consistency from a solid, hard, and slightly cohesive one typical of young cheeses to a cohesive, plastic, and homogeneous texture typical of mature cheeses [4]. As a result of proteolysis, peptides are released, which serve as predictors for the formation of flavoring substances because of biochemical reactions in cheeses [5]. However, an excessively high degree of proteolysis leads to the formation of an undesirable texture for cheese: viscous, sticking to the knife when cutting. Also, during deep hydrolysis of caseins, peptides with a bitter taste are formed [6–8].

FOR CITATION: Myagkonosov, D. S., Abramov, D. V., Delitskaya, I. N., Bukcharina, G.B. (2023). Influence of different milk-clotting enzymes on the quality and shelf life of semihard cheeses. *Food Systems*, 6(4), 477-487. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-477-487>

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Мягконосов, Д. С., Абрамов, Д. В., Делицкая, И. Н., Бухарина, Г.Б. (2023). Влияние различных молокоосвертывающих ферментов на качество и сроки хранения полутвердых сыров. *Пищевые системы*, 6(4), 477-487. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-477-487>

Excessively fast proteolysis leads to rapid overripening of the cheese and limits the shelf life of the cheese [9]. Finding a balance between cheese flavor development and long shelf life of cheese is of great interest. Considering the key role of MCE in the cheese maturation, the selection of MCE with certain properties can be one of the methods for creating a technology for cheese with a pronounced taste and a long shelf life. Currently, the cheesemaker has access to numerous industrially produced brands of MCEs of different origin (animal, microbial and recombinant types), which have different properties [10–12]. The purpose of this study is to evaluate the quality (taste and texture) of semi-hard cheeses made using MCEs from different origins.

2. Materials and methods

2.1. Materials

For the purposes of test manufacture, milk was used from the single supplier-manufacturer — AgriVolga, LLC (Yaroslavl region, Burmasovo village). In the cheese production, a lactic acid starter based on the BK-Uglich-No. 4 bacterial concentrate (the Federal State Budgetary Scientific Institution “Experimental Biofactory”, Russia) was used; it consisted of a set of cultures of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, and was preliminary activated in sterilized milk. Milk-clotting enzyme preparations of various origins (animal, microbial and recombinant) and with various levels of milk-clotting and proteolytic activity were used for milk coagulation:

- ❑ Chy-max® Supreme 1000 (recombinant camel chymosin with a modified amino acid sequence; nominal milk-clotting activity — 1,000 IMCU/g; proteolytic activity — 0.28 units of PA /g; manufacturer — Chr Hansen A/S, Denmark);
- ❑ Chy-max® Extra 600 Liquid (recombinant calf chymosin of genetic variant “B”; nominal milk-clotting activity — 600 IMCU/g; proteolytic activity — 0.48 units of PA/g; manufacturer — Chr Hansen A/S, Denmark);
- ❑ Naturen® Extra 220 NB (enzymatic extract from the stomachs of calves with a mass fraction of chymosin of at least 95%; nominal milk-clotting activity — 220 IMCU/g; proteolytic activity — 0.95 units of PA/g; manufacturer — Chr Hansen A/S, Denmark);
- ❑ Fromase® 750 XLG (protease of the fungus *Rhizomucor miehei*; nominal milk-clotting activity — 750 IMCU/g; proteolytic activity — 56.91 units of PA/g; manufacturer — DSM Food Specialties, France);
- ❑ FS10 “Bovine pepsin” (enzymatic extract from the stomachs of adult cattle with a mass fraction of chymosin of at least 10%; nominal milk-clotting activity — 1,000 IMCU/g; proteolytic activity — 14.39 units of PA/g; manufacturer — Zavod endokrinnykh fermentov, LLC, Russia).

2.2. Methods

2.2.1. Methods for studying the properties of milk-clotting enzymes

The determination of the total milk-clotting activity was conducted according to GOST ISO 11815–2015¹.

The determination of the total proteolytic activity was conducted according (Anson method modification on haemoglobin) to GOST 34430–2018², as applied to weakly acidic proteases (at pH 5.3).

2.2.2 Cheese production process

Model semi-hard cheeses were made with a mass fraction of moisture of 42% (in fact, $41.87 \pm 0.94\%$), 32% of fat (in fact, $32.03 \pm 1.07\%$), 20% of protein (in fact, $19.96 \pm 0.53\%$). Our previous article [13] described the technological regulations for cheese production in detail. Briefly, the cheese production process was as follows: cheeses were made from normalized milk with a mass fraction of fat of 5% and protein of 3.2%, using a starter from mesophilic lactococci, processed at a cooking temperature of 40–41 °C without washing cheese curd with water. The resulting cheeses were salted by immersion in brine, dried, and packed in Amivak CH-B polymer film bags (Atlantis-Pak, Russia). The maturation of cheeses took place at a temperature of 11 ± 1 °C for 60 days. Mature cheeses were stored at 4 ± 2 °C for 90 days. Analysis of the composition and sensory properties of cheeses was performed at the beginning of the ripening period (7 days), at the end of the ripening period (60 days), and at the end of the storage period (150 days).

2.2.3. Methods for determining the composition and degree of proteolysis of cheeses

The active acidity of cheeses was determined on a pH-150MI pH meter (Izmeritelnaya Tekhnika, LLC, Russia) equipped with a FC200B combined pH electrode (Hanna Instruments Inc., USA) in a cheese suspension prepared by grinding 10 g of cheese with 10 cm³ of deionized water.

The mass fraction of moisture in cheeses was determined by drying at a temperature of 102 ± 2 °C according to the Russian state standard GOST 3626–73³.

The mass fraction of fat in cheeses was determined by the acid method according to the Russian state standard GOST R55063–2012⁴.

The mass fraction of total protein in cheeses was determined by the Kjeldahl method according to the Russian state standard GOST R54662–2011⁵.

The degree of proteolysis in cheeses was evaluated (in percent) as the ratio of the content of water-soluble nitrogen to the content of total nitrogen in cheeses. Determination of the content of water-soluble nitrogen was conducted in aqueous extracts from cheeses obtained by the method of Kuchroo and Fox, in the modification described in [14].

The molecular weight distribution of soluble proteins in cheese was determined by high resolution gel filtration using an AKTA Pure 25 chromatographic system (Cytiva, Sweden) equipped with a Superose 12 10/300 GL column (GE Healthcare, Sweden). Eluent was aqueous solution of 0.05 M Na₂HPO₄ + 0.15 M NaCl (pH 6.50), eluent flow rate was 0.5 ml/min; detector wavelength was 280 nm. The column was calibrated according to the release time of protein substances with a known molecular weight: IgG (180 kDa), aldolase (158 kDa), BSA (69 kDa), ovalbumin (43 kDa), β-Lg (36.0 kDa), α-La (14.4 kDa), cytochrome C (12.3 kDa), tryptophan (0.204 kDa). The calibration curve was based on a logarithmic regression model [15]. For analysis, aqueous extracts from cheeses, prepared to determine the mass fraction of soluble protein, and additionally filtered on cellulose acetate filters with a pore size of 0.45 μm, were used (Vladipor, Russia).

2.2.4 Rheology

The rheological indicators of cheeses were studied by the large strain uniaxial compression method using a structure meter «Instron 1000» (Instron Corp., USA) according to the method of Madadlou et al [16] with modifications. Cylindrical specimens 15 mm in diameter and 20 mm height were cut from the cheese block. The cheese samples were immediately placed in an air-tight container to prevent dehydration. The samples were kept for 4 hours to reach a temperature of 22 ± 1 °C, at which the measurements were conducted. Uniaxial compression was conducted at a rate of 50 mm/min to a sample compression ratio of 60% (up to a sample height of 8 mm). As a result of measurements, a force-strain curve was obtained.

The compressive stress at fracture of the sample was calculated using the equation (1):

$$\sigma_f = \frac{F_f}{A}, \quad (1)$$

where σ_f is the compressive stress at fracture of the sample, Pa;

F_f is the force applied to the sample surface at the moment of fracture, N;

A is the cross-sectional area of the sample, m².

The compressive stress at fracture of the sample was calculated at the inflection point on the force-compression curve. The inflection suggests crumblingness resulting from body breakdown. The change in the cross-sectional area of the sample because of deformation was not considered.

2.2.5. Microstructure research

The microstructure of cheeses was studied by light microscopy in transmitted light, on microsections of cheeses 100 ± 10 μm thick. Photographs were taken with a digital camera “Canon EOS600D”. The photographs were corrected using the Digital Photo Professional software v.4.5 (Canon Inc.).

2.2.6. Design of the experiment and statistical data processing

The study was based on the design of a factorial experiment [17], which included two categorical factors: the “MCE type” factor and the “MCE dose” factor. The experiments were conducted in two replicates in a randomized order. Our previous article [13] provides the description of the experiment design.

To assess the joint influence of experimental factors and cheese shelf life on response variables (pH, degree of proteolysis and rheological parameters), the selected plan of the full factorial experiment was modified into a “split-plot design” [18] by introducing an additional factor “Storage duration” (Age).

Statistical processing of experimental data was conducted using the Statistica® software package (ver. 5.5, StatSoft, USA).

³ GOST 3626–73 Milk and milk products. Methods for determination of moisture and dry substances. M.: Standartinform, 2009. — 11 p.

⁴ GOST R55063–2012 Kinds of cheese and processed cheese. The rules of tests acceptance, sampling, and control methods. M.: Standartinform, 2013. — 28 p.

⁵ GOST R54662–2011 Cheeses and processed cheeses. Determination of protein mass fraction by the Kjeldahl method. M.: Standartinform, 2012. — 16 p.

¹ GOST ISO 11815–2015 Milk. Determination of the total milk-clotting activity of bovine rennet. M.: Standartinform, 2015. — 10 p.

² GOST 34430–2018 Enzyme preparations for food industry. Method for the determination of proteolytic activity. M.: Standartinform, 2018. — 12 p.

Table 1. Mean squares and probabilities (in parentheses), and R² values for the ANOVA model for response variables (for MCEs of Naturen, Pepsin and Fromase at low and medium introduction doses)

Таблица 1. Средняя сумма квадратов отклонений, уровень статистической достоверности и коэффициенты детерминации модели ANOVA для переменных отклика (для МФ Naturen, Пепсин и Fromase при низких и средних дозах внесения)

Factor	df	pH	Proteolysis degree, %	Fraction of bitter peptides (1–5 kDa), mV*s	Fracture stress, kPa
Type	2	0,0014 (–)	6,471 (***)	29362 (**)	358,4 (–)
Dose	1	0,0035 (–)	30,192 (***)	184876 (***)	381,0 (–)
Age	2	0,0698 (***)	255,206 (***)	1150686 (***)	31198,8 (***)
Type*Dose	2	0,0036 (–)	1,064 (–)	19109 (*)	182,7 (–)
Type*Age	4	0,0003 (–)	2,671 (**)	13669 (*)	85,6 (–)
Dose*Age	2	0,0031 (–)	1,406 (–)	17741 (*)	83,9 (–)
Error	28	0,0013	0,588	5081	113,8
R ²		0,85	0,97	0,95	0,95

df — number of degrees of freedom

Factor keys: Type — MCE type; Dose — MCE dose; Age — shelf life of the cheese. Error — share of the response variable variation related to an error;

R² — coefficient of determination for the ANOVA model.

The level of statistical significance of the factor effect evaluation (in parentheses): “–” — not statistically significant ($p > 0.05$); “*” — $p < 0.05$; “**” — $p < 0.01$; “***” — $p < 0.001$.

3. Results and discussion

The influence of the experimental factors on the response variables was evaluated: pH, the degree of proteolysis, indicators of the molecular weight distribution of proteolysis products (the content of peptides with mass of 1 to 5 kDa) and rheological indicators (compressive stress at fracture) of test cheeses.

The experiment matrix held an incomplete set of combinations of factors “MCE type” and “MCE dose”. No data were available for Fromase and “Bovine Pepsin” at high introduction dose (6,000 IMCU/100 kg milk) and data for Chy-max Extra and Chy-max Supreme were also missing at low introduction dose (1,500 IMCU/100 kg milk). As a result, it was impossible to process the data by the ANOVA method simultaneously for all 5 types of the investigated MCEs with purpose of defining the influence of paired interactions of factors on the response variables. For processing, the experiment matrix was divided into two separate matrices; each matrix had data for 3 types of MCEs:

- 1) Calf rennet (Naturen) and rennet substitutes of animal origin (“Bovine Pepsin”) and microbial origin (Fromase), at low (1,500 IMCU/100 kg milk) and medium (3,000 IMCU/100 kg milk) introduction doses;
- 2) Calf rennet (Naturen) and MCEs based on recombinant chymosins — Chy-max Extra and Chy-max Supreme, at medium (2,000 for Chy-max Supreme and 3,000 IMCU/100 kg for Naturen and Chy-max Extra) and high (5,000 for Chy-max Supreme and 5,000 IMCU/100 kg for Naturen and Chy-max Extra) introduction doses.

Tables 1 and 2 give the results of evaluating the effect of factors and their pair interactions on the response variables obtained by the ANOVA method.

Further, when discussing the results of the analysis of variance, we will refer to the data from Table 1 as obtained “at low and medium doses of MCEs”, the data from Table 2 are obtained “at medium and high doses of MCEs”, without additional interpretation of the MCE type.

The results of the analysis of variance allow drawing the following conclusions on the influence of factors on the response variables.

3.1. Active acidity (pH)

There is a statistically significant influence of the “age of cheese” factor on the pH level. The influence of cheese age on pH is associated with biochemical reactions that occur at various stages of cheese ripening and storage. If in the period from 7 to 60 days, the decrease in pH is associated with the accumulation of acid due to lactose metabolization, then in the period from 60 to 150 days, the increase in pH occurs due to the accumulation of proteolysis products with buffer properties [19,20].

There is a statistically significant effect of the MCE dose on the pH of cheeses. The use of MCEs at high introduction doses (5,000 IMCU/100 kg of milk for Chy-max Supreme and 6,000 IMCU/100 kg of milk for MCEs of Naturen and Chy-max Extra) results in cheeses having significantly ($p < 0.05$) a lower average pH level throughout the ripening and storage period than cheeses produced with medium and low doses of MCEs (1,500–3,000 IMCU/100 kg of milk).

Table 2. Mean squares and probabilities (in parentheses), and R² values for determination of the ANOVA model for response variables (for MCEs of Naturen, Chy-max Extra and Chy-max Supreme, at medium and high introduction doses)

Таблица 2. Средняя сумма квадратов отклонений, уровень статистической достоверности и коэффициенты детерминации модели ANOVA для переменных отклика (для МФ Naturen, Chy-max Extra и Chy-max Supreme, при средних и высоких дозах внесения)

Factor	df	pH	Proteolysis degree, %	Fraction of bitter peptides (1–5 kDa), mV*s	Fracture stress, kPa
Type	2	0,0035 (–)	239,382 (***)	843696 (***)	535,9 (*)
Dose	1	0,0128 (**)	47,748 (***)	272727 (***)	690,4 (*)
Age	2	0,0939 (***)	232,521 (***)	804733 (***)	32776,2 (***)
Type*Dose	2	0,0015 (–)	5,309 (***)	42513 (**)	271,4 (–)
Type*Age	4	0,0002 (–)	27,314 (***)	133447 (***)	239,9 (–)
Dose*Age	2	0,0009 (–)	0,281 (–)	33013 (**)	5,3 (–)
Error	28	0,0011	0,458	5841	108,8
R ²		0,88	0,99	0,964	0,96

df — number of degrees of freedom.

Factor keys: Type — MCE type; Dose — MCE dose; Age — shelf life of the cheese. Error — share of the response variable variation related to an error;

R² — coefficient of determination for the ANOVA model.

The level of statistical significance of the factor effect evaluation (in parentheses): “–” — not statistically significant ($p > 0.05$); “*” — $p < 0.05$; “**” — $p < 0.01$; “***” — $p < 0.001$.

The MCE dose influences the pH level of cheeses indirectly through the effect on the moisture content of cheeses. The data presented in a previous article [13] show that increasing the MCE dose leads to a reduction in the duration of curd processing and to the preservation of more moisture in the cheese. According to the moisture content at the beginning of ripening (7 days), cheeses made with different doses of MCEs were arranged in the following order: cheeses with a high dose of MCE ($42.38 \pm 1.28\%$ moisture) > cheeses with an average dose of MCE ($41.59 \pm 1.22\%$ moisture) $\approx$ cheeses with a low dose of MCE ($41.33 \pm 0.81\%$ moisture). Cheeses with a high moisture content had a greater amount of lactose, the metabolization of which by starter microorganisms led to a decrease in pH; the greater the lactose content was, the greater the decrease in pH was.

Figure 1 shows the influence of experimental factors on the dynamics of changes in the pH of cheeses during ripening and storage.

In Figure 1, the graphs of changes in the pH show, that the pH level in the test cheeses during the ripening and storage period is within 5.05 ± 0.10 pH units and is close to the pH level at which PA of MCE was determined under “in vitro” conditions (pH 5.3). So, it is possible to correlate the estimate of the PA value of MCE measured “in vitro”, which is used for a comparative assessment of MCEs of diverse types in scientific works [10,11] with the actual proteolytic action of MCE in cheeses under real conditions.

3.2. Degree of proteolysis

The results of the analysis of deviation (see Tables 1 and 2) show that there is a strong, statistically significant influence ($p < 0.001$) of all experimental factors (“MCE type”, “MCE dose” and “cheese age”) on the degree of proteolysis in cheeses. Figure 2 displays the graphs with the connection between the degree of proteolysis in cheeses and influencing factors.

In Figure 2, the graphs show that the degree of proteolysis in cheeses increases throughout the entire period of ripening and storage. An increase in the MCE dose leads to an increase in the rate of accumulation of proteolysis products in cheeses. However, there was no direct connection between the rate of the proteolysis process and the level of PA of MCE. Cheeses made with Chy-max Supreme, which has the lowest level of PA among all studied MCEs, have the lowest level of proteolysis. For other types of MCEs, there is no proportionality between PA of MCE and the rate of proteolysis in cheeses made with them. At the same time points, there were no statistically significant ($p < 0.05$) differences in the degree of proteolysis between cheeses produced with equal doses of MCEs of Naturen Extra, Chy-max Extra, “Bovine Pepsin” or Fromase, which had various levels of PA. Therefore, the proteolytic productivity of MCEs in cheeses cannot be assessed from the PA level of MCE measured “in vitro”.

The results obtained are related to the fact that the level of proteolysis in cheeses depends not only on the total proteolytic activity of MCE, but also on the degree of MCE transition into the cheese mass. It has been set up that the amount of MCE passing from milk to the cheese mass varies

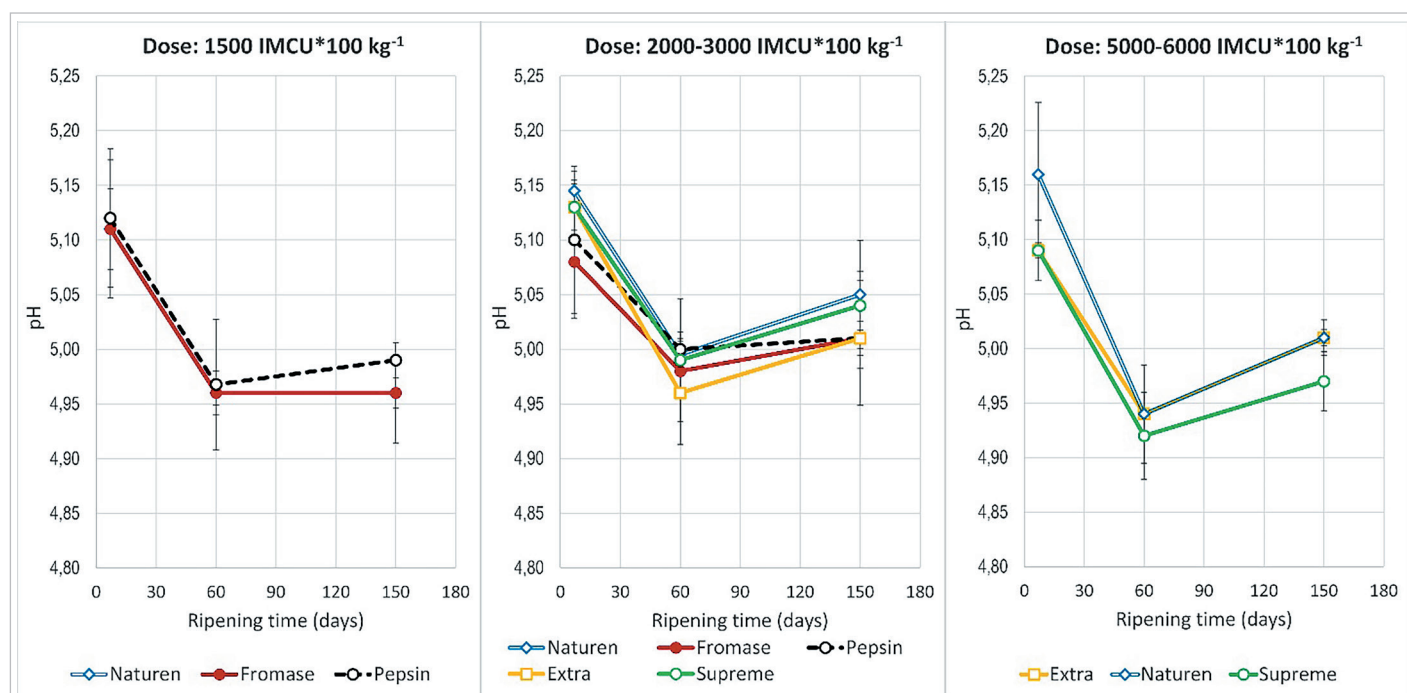


Figure 1. Dynamics of changes in the active acidity of samples of test cheeses produced with diverse types and doses of MCEs during storage. Keys of MCE brands on the graph: Fromase – Fromase 750 XLG; Pepsin – “Bovine Pepsin” FS-10; Naturen – Naturen Extra 220; Extra – Chy-max Extra; Supreme – Chy-max Supreme. Scatter bars show “ $\pm$ standard deviation”

Рисунок 1. Динамика изменения активной кислотности образцов экспериментальных сыров, произведенных с разными типами и дозами МФП, в процессе хранения. Обозначения марок МФ на графике: Fromase – Fromase 750 XLG; Pepsin – «Пепсин говяжий» ФС-10; Naturen – Naturen Extra 220; Extra – Chy-max Extra; Supreme – Chy-max Supreme. Планки разброса показывают « $\pm$ стандартное отклонение»

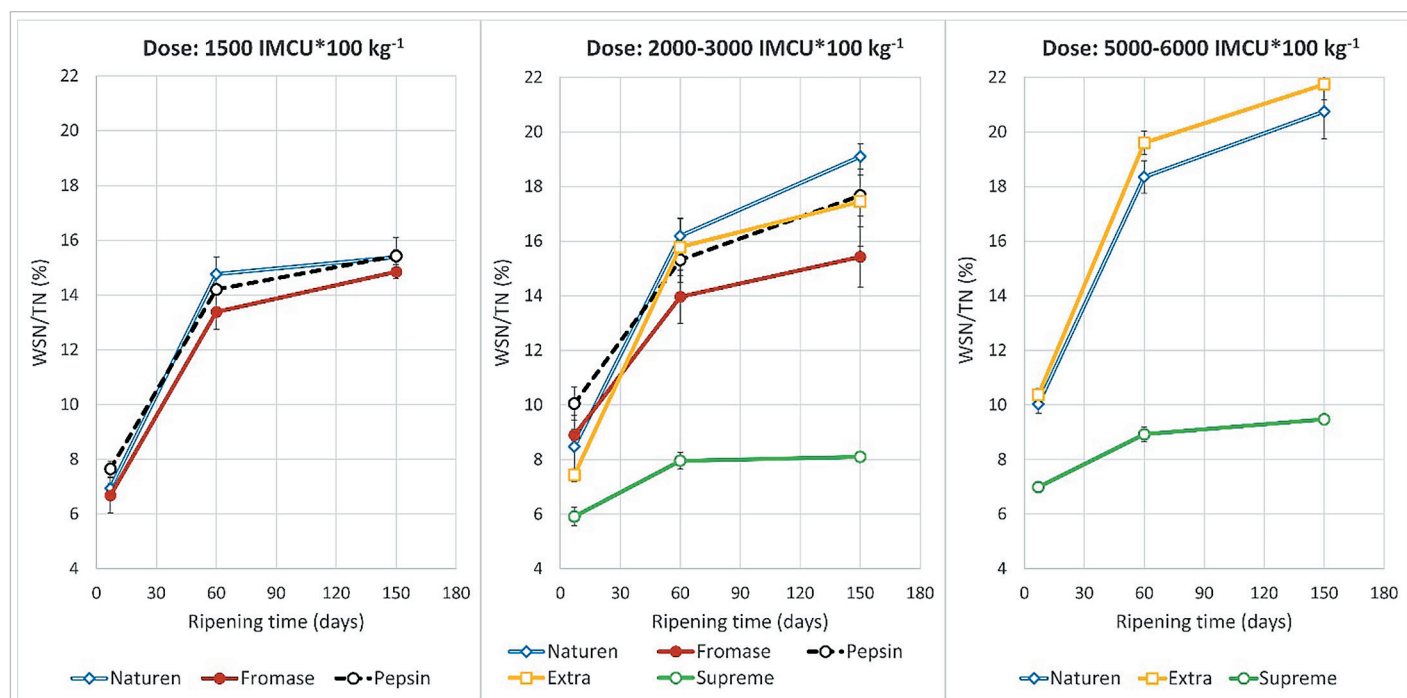


Figure 2. Dynamics of proteolysis in samples of test cheeses produced with diverse types and doses of MCEs during storage. The keys of the MCE brands on the graph are similar to Figure 1. Scatter bars show “ $\pm$ standard deviation”

Рисунок 2. Динамика протеолиза в образцах экспериментальных сыров, произведенных с разными типами и дозами МФП, в процессе хранения. Обозначения марок МФ на графике аналогичны с Рисунок 1. Планки разброса показывают « $\pm$ стандартное отклонение»

depending on the MCE type and on the technological modes of cheese production. In the cheese curd, up to 30% or more of chymosin and no more than 2–3% of proteases of microbial origin are preserved [1,2]. Lowering the pH of the curd increases the amount of retained chymosin but does not increase the proportion of pepsin and microbial coagulants [21–24]. Small amounts of pepsin and microbial protease (Fromase) in cheese offset their high PA. As a result, cheeses made with these MCEs achieve the same or lesser degree of proteolysis than cheeses produced with calf chymosin-based MCE (MCEs of Naturen, Chy-max Extra), which have lower levels of PA (Figure 2).

3.3. Formation of small peptides

In addition to proteolytic activity, MCEs are characterized by proteolytic specificity, which is expressed in the preferential release of peptides with a certain molecular weight from the hydrolysable protein. Chymosin-based MCEs (Naturen, Chy-max Extra and Chy-max Supreme) break down caseins with the formation of a large amount of proteolysis products with a large molecular weight (over 10 kDa), including insoluble ones [6], while MCEs based on pepsin and microbial proteases (Fromase) are capable to continue the hydrolysis with the formation of a significant amount of peptides with a low molecular weight (less than 10 kDa) [25,26]. To characterize the

peptide composition of proteolysis products, the indicator “molecular weight distribution” is used.

An important indicator of molecular weight distribution is the concentration of peptides with a molecular weight of 1 to 5 kDa. It is known that peptides with a molecular weight of less than 0.5 to 3 kDa relate to the

formation of the bitter taste of cheese [6,27,28]. Peptides with a molecular weight of more than 6 kDa, even containing hydrophobic amino acids, do not have a bitter taste [6]. Excessive accumulation of hydrophobic peptides with a molecular weight of less than 6 kDa in cheeses is the cause of the bitter taste of the product. The most pronounced bitter taste is imparted by peptides with a molecular mass in the range of 0.5–3 kDa [27,28]. When comparing cheeses made with camel chymosins (Chy-max M) and calf chymosins (Chy-max M), a higher content of these peptides was found in cheeses made using calf chymosin, which had the consequence of more pronounced bitter taste in them [29].

Figure 3 shows the molecular weight distribution of water-soluble proteolysis products in cheeses with different severity of bitter taste (authors' own data).

The results of chromatographic studies, given in Figure 3, confirm the connection described in the literature between the strength of bitter taste and the quantitative content of peptides with a mass of 1–5 kDa in cheese.

The results of the analysis of variance (see Tables 1 and 2) show that there is a strong, statistically significant influence ($p < 0.001$) of all experimental factors (“MCE type”, “MCE dose” and “cheese age”) on the number of peptides with a mass of 1–5 kDa accumulated in cheeses. Figure 4 presents the graphs showing the connection between the number of peptides with a mass of 1–5 kDa accumulated in cheeses and influencing factors.

In Figure 4, the data show that with an increase in the MCE dose, the amount of 1–5 kDa peptides accumulated in cheeses increases. The MCE type affects the amount of 1–5 kDa peptides accumulated in cheese. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the content of 1–5 kDa peptides between cheeses made with the same MCE doses of Naturen Extra, Chy-max Extra, “Bovine Pepsin” or Fromase at the same time points. In cheeses with Chy-max Supreme, the smallest quantity of bittering-forming peptides appears, which significantly ($p < 0.05$) differs from their content in cheeses with other studied types of MCEs.

Sensory assessment of the intensity of bitter taste in cheeses was proportional to the content of peptides with a molecular weight of 1–5 kDa (Figure 4).

Literature [10,30,31] hold numerous references to the ability of MCE of microbial origin, based on the *R. miehei* protease (Fromase), to form a strong bitter taste in cheeses. In our study, the degree of bitterness in cheeses made with Fromase was not greater than the degree of bitterness in other cheese varieties. At introduction dose of MCE of 1,500–3,000 IMCU/100 kg of milk, cheeses made with Fromase have the same or less pronounced bitter taste than cheeses produced with Chy-max Extra, Naturen or “Bovine Pepsin”.

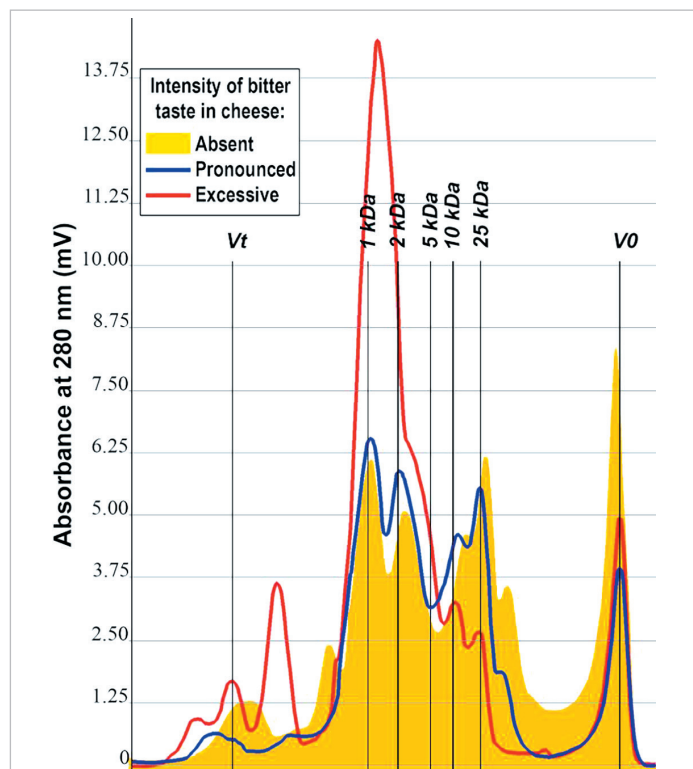


Figure 3. Molecular weight distribution of water-soluble products of proteolysis in cheeses with different strength of bitter taste

Рисунок 3. Молекулярно-массовое распределение водорастворимых продуктов протеолиза в сырах с разной выраженностью горького вкуса

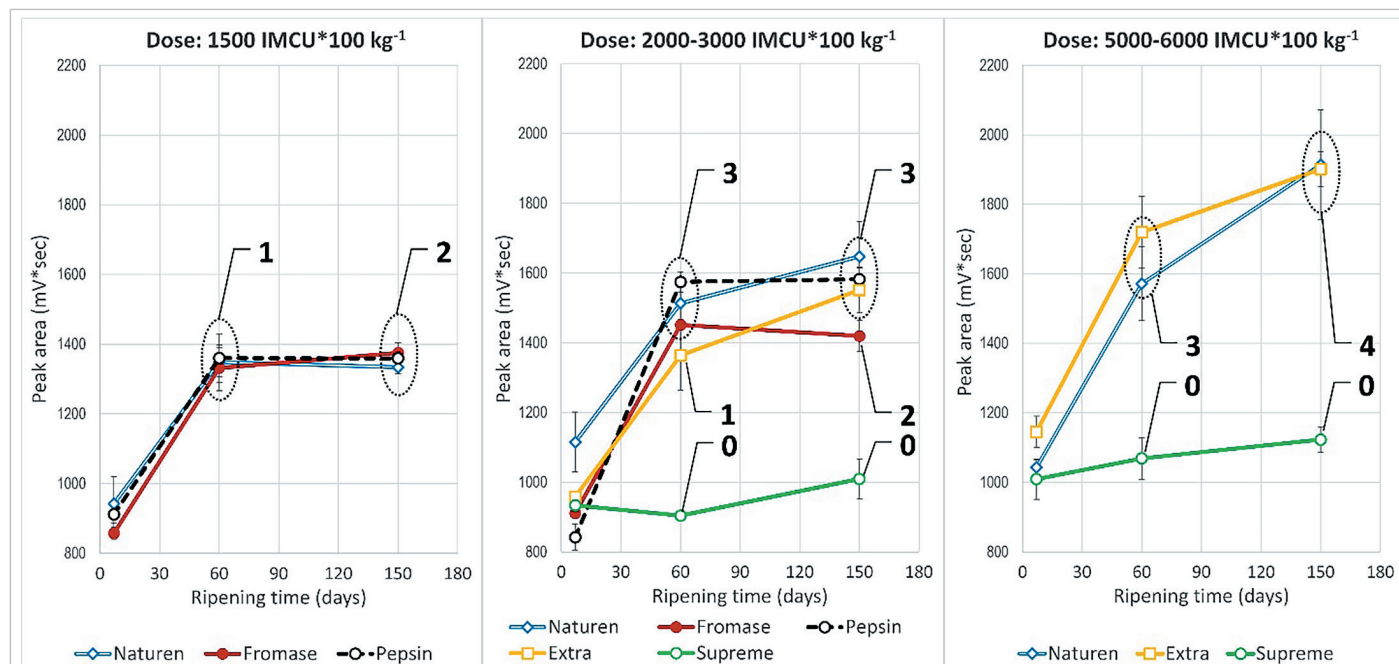


Figure 4. Dynamics of accumulation of bitter peptides in samples of test cheeses produced with diverse types and doses of MCEs during storage. The keys of the MCE brands on the graph are similar to Figure 1. Scatter bars show “± standard deviation”. The callouts display the sensory assessment of the intensity of bitter taste in cheeses on a conditional

5-point scale: 0 – absent; 1 – very weak; 2 – weak; 3 – medium; 4 – pronounced

Рисунок 4. Динамика накопления горьких пептидов в образцах экспериментальных сыров, произведенных с разными типами и дозами МФП, в процессе хранения. Обозначения марок МФ на графике аналогичны с Рисунком 1. Планки разброса показывают «± стандартное отклонение».

Выводы показывают сенсорную оценку интенсивности горького вкуса в сырах по условной 5-балльной шкале: 0 – отсутствует; 1 – очень слабая; 2 – слабая; 3 – средняя; 4 – выраженная

At an equal dose of MCE, cheeses made with bovine pepsin did not differ in the strength of bitter taste from cheeses produced with calf rennet (Naturen Extra). This replicates the results of Emmons et al [32] in a comparative study of calf rennet and bovine pepsin in the production of Cheddar cheese.

The obtained data say that during the production of semi-hard cheeses it is undesirable to use MCEs based on calf chymosins of both natural origin (Naturen) and recombinant origin (Chy-max Extra) at a dose of 6,000 IMCU/100 kg of milk due to the risk of bitter cheese taste during storage.

3.4. Rheological indicators

The value of fracture stress (σ_f) is equal to the pressure at which the material structure fractures [33]. The higher the value of fracture stress is, the higher the strength and coherence of the cheese mass are [3]. The value of fracture stress gives information about the rheological behavior of cheeses during their chewing or industrial size-reduction operation such as shredding, grating, shearing and portion cutting.

The results of the ANOVA (see Tables 1 and 2) show that the value of fracture stress is influenced by the age of the cheese, and at medium and high doses of MCEs, by the factors of “MCE type” and “MCE dose”. Figure 5 displays the graphs showing the relationship between fracture stress and experimental factors.

In Figure 5, the graphs show that, there is an increase in the average value of fracture stress over time, and then a decrease for all test variants of cheeses. There are no statistically significant differences in the magnitude of fracture stress between the variants of cheeses produced with the same doses of MCEs of diverse types at the same time points (Tukey's test, $p < 0.05$). An exception is a statistically significant higher level of fracture stress in cheeses produced with a high dose of Chy-max Supreme at the age of 150 days, in comparison with cheese variants made with Naturen and Chy-max Extra (Tukey's test, $p < 0.05$), which explains the revealed ANOVA influence of the factors “MCE type” and “MCE dose” on fracture stress.

The statistically significant dependence of fracture stress on the “Age” factor, proved by the results of the analysis of variance, means that fracture stress changes under the influence of factors, which, in turn, are influenced by the “Age” factor. According to the literature data, the structure of cheese changes over time under the influence of demineralization, proteolysis, and dehydration of the cheese mass [3].

At the first stage of maturation, the strength and plasticity of cheese consistency depends on the amount of calcium ions associated with casein molecules and combining them into aggregates [3]. As a result of the metabolization of lactose by bacteria, lactic acid accumulates in the cheese mass, accompanied by a decrease in pH. With a decrease in pH, calcium ions are separated from caseins (demineralization), resulting in a decrease

in cohesion and an increase in the plasticity of the cheese mass [34], as a result of which the fracture stress index decreases.

Insignificant differences in pH between the studied cheese varieties at the beginning of the ripening period (7 days) led to the absence of differences in the level of fracture stress between them (Tukey's test, $p < 0.05$). At the age of 7 days, all cheese variants had the same consistency, which can be described as “elastic, slightly brittle”.

After completion of the metabolization of lactose and stabilization of the pH in the cheese, a balance is set up between the calcium ions, which are in the casein-bound and soluble forms. A further change in the rheological properties of the cheese mass occurs under the influence of proteolysis and dehydration [19].

Figure 6 A gives the graph of the dependence of fracture stress on the degree of proteolysis. Figure 6 B gives the graph showing the dynamics of cheese dehydration.

The graph of fracture stress versus the degree of proteolysis (Figure 6A) shows that the data points are divided into 2 groups according to the minimum differences: those belonging to fresh cheeses at the age of 7 days and those belonging to mature cheeses at the age of 60 and 150 days. For the group of mature cheeses, the graph (Figure 6A) shows a trend — with an increase in the degree of proteolysis, the value of fracture stress decreases. The division of data into groups is a sign of the influence on the rheological parameters of cheeses of factors other than proteolysis. At the same time, the nature of these factors differs for fresh and mature cheeses.

In the studied cheeses, the process of conversion of lactose into lactic acid, accompanied by a decrease in pH, continues after 7 days (up to about 15 days). Therefore, the pH of the studied cheeses at the age of 60 days is lower than at the age of 7 days (Figure 1). Decrease in pH of less than 5.2 units leads to a significant removal of calcium ions from bonds with casein, as a result of which the cheese mass becomes less cohesive, and at a low moisture content in the cheese, even crumbly [34–36]. In the range of pH of 4.90–5.05, a consistency typical of Cheddar cheese is formed — dense, moderately coherent, slightly crumbly [3].

In all studied cheeses, by the end of the ripening period (60 days), the acidity was in the range of 5.0 ± 0.05 pH units (Figure 1). The consistency of cheeses at this age was characterized as “brittle, crumbly”. At the same time, cheese variants made using Chy-max Supreme had a firmer and less plastic consistency compared to cheese variants produced with other types of MCEs. Figure 6A shows that data points for cheeses made with Chy-max Supreme stand out as a separate subgroup from the group of mature cheeses. Of all mature cheese samples, those made with Chy-max Supreme have the highest fraction stress with the lowest levels of proteolysis (Figure 5).

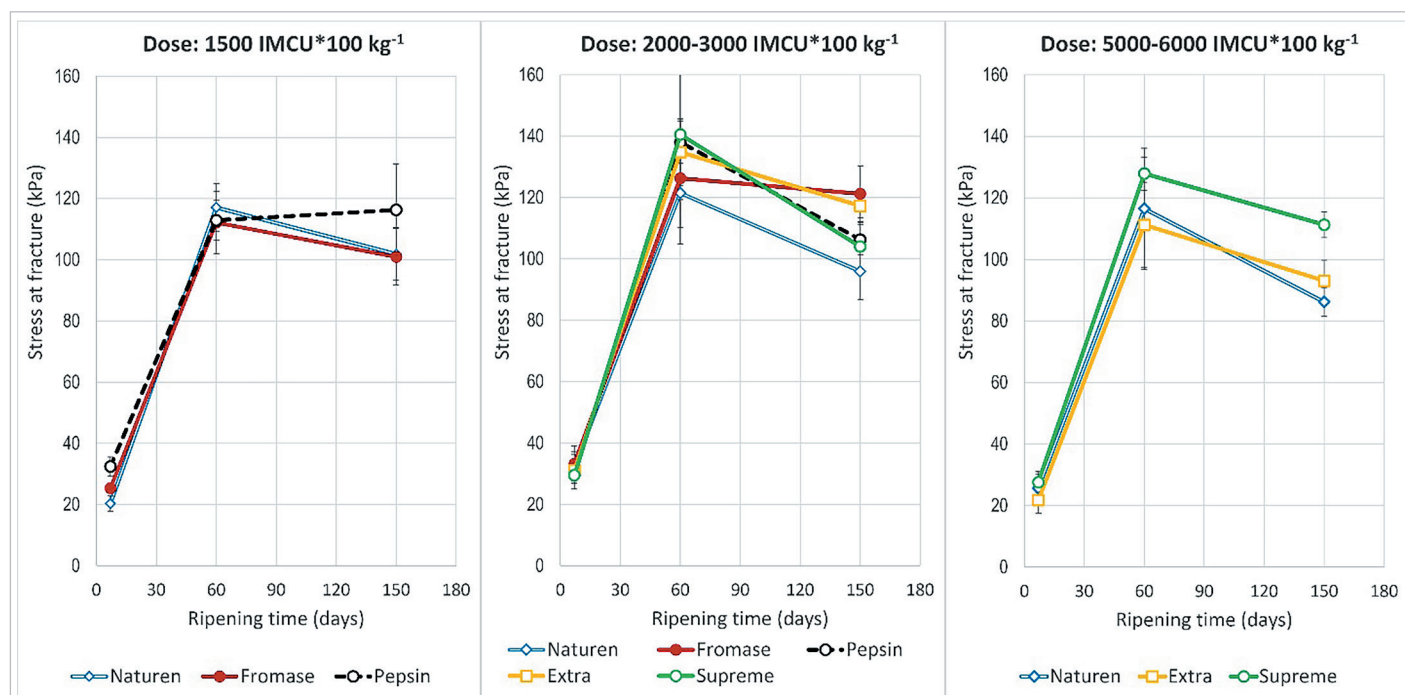


Figure 5. Dynamics of change in the indicator “stress at fracture” in samples of test cheeses produced with diverse types and doses of MCEs during storage. The keys of the MCE brands on the graph are similar to Figure 1. Scatter bars show “ $\pm$ standard deviation”

Рисунок 5. Динамика изменения показателя «напряжение сжатия при разрушении» в образцах экспериментальных сыров, произведенных с разными типами и дозами МФП, в процессе хранения. Обозначения марок МФП на графике аналогичны с Рисунком 1. Планки разброса показывают « $\pm$ стандартное отклонение»

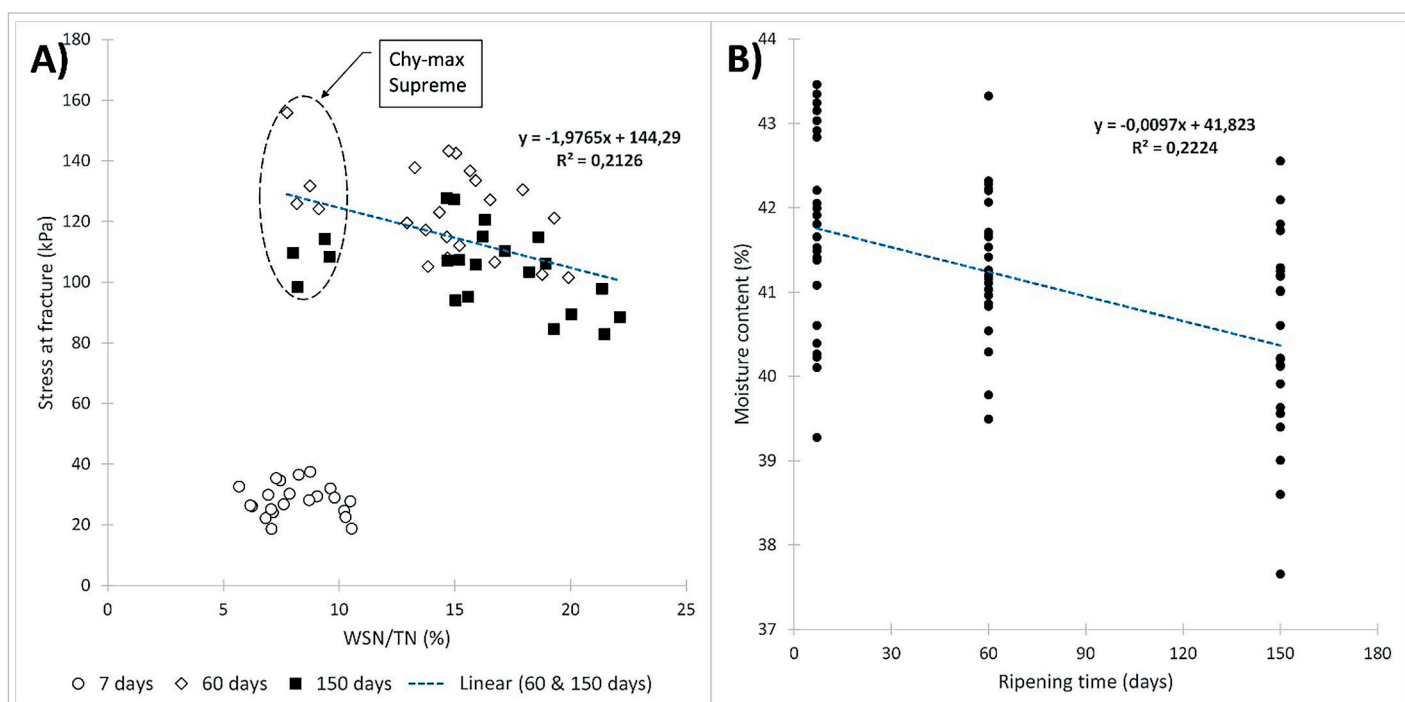


Figure 6. Dependences: A) indicator of fracture stress of the cheese mass on the degree of proteolysis (data are presented on the indicators of cheese at the age of 7, 60 and 150 days); B) moisture content in samples of test cheeses on the age

Рисунок 6. Зависимости: А) показателя fracture stress сырной массы от степени протеолиза (представлены данные по показателям сыра в возрасте 7, 60 и 150 сут); В) содержания влаги в экзemplарах экспериментальных сыров от возраста

The moisture content affects the texture of cheeses. With a decrease in moisture content, the casein gel network decreases in volume and becomes denser, which leads to an increase in the density and hardness of the cheese mass [3,19]. The graph presented in Figure 6B indicates a trend towards a decrease in moisture content in cheeses during ripening and storage, as well as a significant variation in moisture content between individual cheeses at the same time points. The decrease in moisture content and the resulting compaction of the cheese mass explains the absence of a decrease in fracture stress in some types of cheeses in the period from 60 to 150 days (Figure 5), despite the process of softening of the cheese mass under the influence of proteolysis occurring in the same period. Differences in moisture content can explain the significant variation of points compared to the regression line and the low coefficient of determination ($R^2 = 0.21$) of the regression relationship between the degree of proteolysis and fracture stress in mature cheeses (Figure 6 A).

3.5. Microstructure

Microscopic studies of the structure of cheeses have been conducted. The analysis of micropreparations of test variants of semi-hard cheeses confirmed the pattern previously established in the works of other researchers [2,37,38]: the higher the degree of proteolysis is, the higher the degree of hydration of caseins is, and the higher the degree of homogeneity of the cheese structure is. Cheeses with a higher degree of proteolysis are characterized by a more uniform, finely dispersed structure. Cheeses with a lower degree of proteolysis are characterized by a more fragmented structure, with distinct boundaries between cheese grains or with traces of these boundaries. For example, Figure 7 shows photos of the microstructure of cheeses made using different doses of Naturen, at different ages, with different degrees of proteolysis and various levels of fracture stress.

The structure of cheeses at the level of microstructure forms their rheological properties [3]. The structure of a fresh cheese consists of individual pressed cheese grains with intergranular space filled with moisture (Figure 7, cheeses aged 7 days). Cheese mass, fragmented into individual grains, has a low cohesion, and is destroyed along the boundaries of grain joints under the influence of even a small load. The work of Tunik et al [39] found that Cheshire cheese, which has the same protein and fat content and pH level as Cheddar cheese, has almost 2 times lower levels of elasticity modulus (G'), viscosity modulus (G'') and complex viscosity (η^*) due to the more fragmented structure. Due to the low cohesion of the structure, test cheeses at the age of 7 days had a low level of stress at fracture (Figure 5).

In maturation of cheeses, proteolysis of caseins of the cheese mass occurs. The peptides formed from caseins have a higher hydrophilicity than the original caseins. This leads to an increase in the moisture-binding capacity

of the casein gel. The mechanically bound water contained in the pores of the casein net is converted into water chemically bound to the charged carboxyl and amino groups of the peptides released during proteolysis of caseins [20]. Increasing the hydration of the casein gel leads to the formation of a homogeneous, cohesive structure of the cheese mass, which has a much higher mechanical strength and requires more load to break it. As a result, in the studied cheeses at the end of the ripening period (60 days), the value of stress at fracture increases (Figure 5). Visually, the process of hydration of the casein net appears in the disappearance of the boundaries between the grains and the "gluing" of the grains (Figure 7, cheeses aged 60 and 150 days). Over time, under the action of proteolysis, an increasing number of caseins is cleaved, as a result of which the mechanical strength of the casein gel decreases. This leads to a decrease in the mechanical strength of the cheese mass and a decrease in the magnitude of the load required for its fracture [3]. As a result, cheeses aged 150 days have a lower level of stress at fracture than cheeses aged 60 days (Figure 5).

Related results were obtained by the authors when studying the effect of proteolysis on the structure of soft cheeses made using diverse types and doses of MCEs [40,41]. At the same time, the significant differences in the effect of proteolysis on the consistency of soft and semi-hard cheeses should be noted. Compared to soft cheeses, due to their lower moisture content, semi-hard cheeses have a denser casein network, which also has a higher cohesiveness, due to the higher content of calcium bound to molecules due to a higher pH level. The dense and coherent casein net of semi-hard cheeses, even after splitting some caseins because of proteolysis, retains high strength. As a result, there are no noticeable differences in rheological characteristics and sensory assessment of consistency in all variants of semi-hard cheeses made with diverse types and doses of MCEs, having differences in the degree of proteolysis. The exception is cheese made with Chy-max Supreme, which has the lowest level of proteolysis and the densest texture among all studied cheese variants.

Conclusion

Based on the data obtained, the following conclusions can be drawn:

Cheeses produced using high doses of MCEs added to milk (5,000–6,000 IMCU/100 kg of milk) have a significantly ($p < 0.05$) lower pH level than cheeses made with medium and low doses of MCEs (1500–3000 IMCU/100 kg of milk). The use of high doses of MCEs for milk coagulation results in a reduction in the processing time of the curd and the production of cheese with a high moisture content. The higher the moisture content of the cheese is, the greater the lactose content is, and the greater the decrease in pH due to the conversion of lactose to acid by starter bacteria is.

An increase in the dose of MCE added to milk leads to an increase in the rate of accumulation of proteolysis products in cheeses. At the same

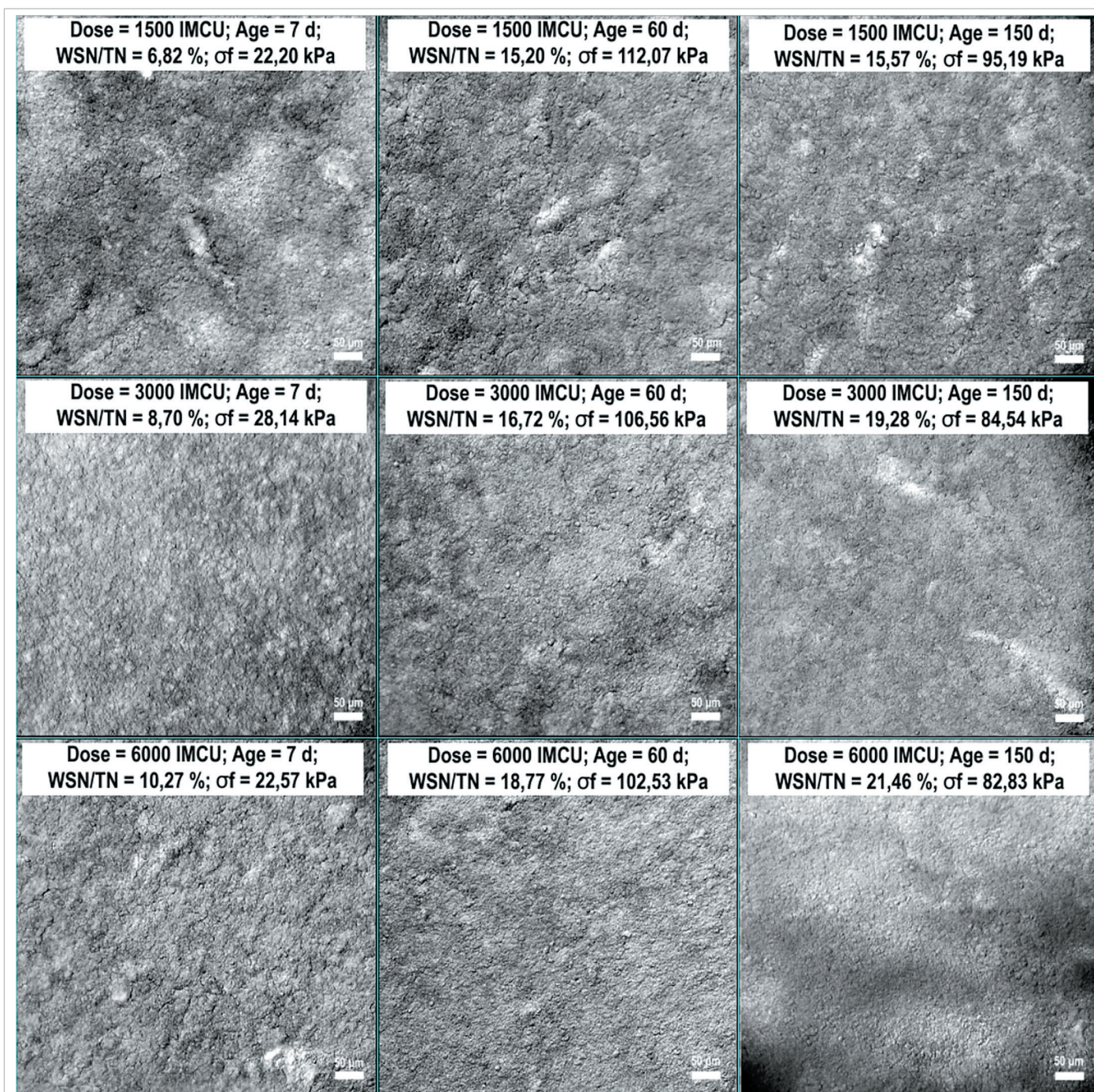


Figure 7. Typical microstructure of cheeses produced using different doses of Naturen during ripening and storage.

Dose – MCE introduction dose (IMCU/100 kg of milk); Age – cheese age (days); WSN/TN – share of soluble nitrogen from the total (%); σ_f – fracture stress (kPa). The scale bars are 50 μ m in length

Рисунок 7. Типичная микроструктура сыров, произведенных с использованием разных доз МФ Naturen, в течение срока созревания и хранения. Dose – доза внесения МФ (IMCU/100 кг молока); Age – возраст сыра (сут); WSN/TN – доля растворимого азота от общего (%); σ_f – fracture stress (кПа). Мерный отрезок равен 50 мкм

time points, there were no significant differences ($p > 0.05$) in the degree of proteolysis between cheeses made using the same dose of distinct types of MCEs. The only difference was cheeses produced with Chy-max Supreme, which had the lowest level of proteolysis ($p < 0.05$). The reason for the lack of differences in the degree of proteolysis between cheeses made with MCEs of Naturen or Chy-max Extra and cheeses made with MCEs of “Bovine Pepsin” or Fromase, which have a significantly higher level of PA, is a small degree of transfer of pepsin and microbial proteases from milk to cheese, which levels their high PA.

With an increase in the MCE dose, the content of peptides with a molecular weight of 1 to 5 kDa increases in cheese. Sensory assessment of the intensity of bitter taste in cheeses was proportional to the content of bitter peptides with a molecular weight of 1–5 kDa. Chy-max Supreme produces the least number of bitter peptides among all MCE variants. At MCE introduction dose of 3,000 IMCU/100 kg of milk, Fromase produces

fewer bitter peptides than Chy-max Extra, Naturen or “Bovine Pepsin”, which have a lower level of proteolytic activity. This shows the high quality of MCEs of microbial origin achieved to date and allows us to recommend MCEs of microbial origin to use in the production of semi-hard cheeses at a dose of up to 3,000 IMCU/100 kg of milk. At MCE introduction dose of 6,000 IMCU/100 kg of milk, cheeses made with Chy-max Extra show an accumulation of bitter peptides at the level of Naturen Extra ($p < 0.05$), which has a higher PA level than that of Chy-max Extra.

For all test variants of cheeses, over time, at first there is a tendency to an increase in the level of fracture stress, and then its decrease. There are no statistically significant differences in the magnitude of fracture stress between the variants of cheeses produced with the same doses of MCEs of diverse types at the same time points ($p > 0.05$). The structure and consistency of the test cheeses depended more on their composition (moisture, protein, fat content) and pH than on the level of proteolysis.

The consistency of the cheeses depended on the structure of the cheeses at the microstructure level. In turn, the microstructure of cheeses depended on the calcium content associated with casein molecules and the degree of casein proteolysis. The crumbling texture of fresh cheeses and low values of fracture stress were associated with a substantial leaching of calcium ions from bonds with caseins and a low water-binding capacity of native caseins. Proteolysis of caseins, which occurs during the ripening of cheeses,

leads to an increase in the water-binding capacity of the cheese mass. In mature cheeses, there is a greater cohesion and a higher level of fracture stress in comparison with fresh cheeses.

The rheology of the cheese mass can be controlled through the degree of casein hydrolysis (by selecting the type and dose of MCE) or by changing the content of micelle-bound calcium paracasein (by adjusting the pH), or both.

REFERENCES

- Bansal, N., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2009). Comparison of level of residual coagulant activity in different cheese varieties. *Journal of Dairy Research*, 76(3), 290–293. <https://doi.org/10.1017/S0022029909004075>
- Soodam, K., Ong, L., Powell, I.B., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2015). Effect of rennet on the composition, proteolysis and microstructure of reduced-fat cheddar cheese during ripening. *Dairy Science and Technology*, 95(5), 665–686. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0250-5>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2017). Cheese: Structure, Rheology and Texture. Chapter in a book: *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, Boston, MA, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7
- Guinee, T.P., O'Callaghan, D.J. (2010). Control and Prediction of Quality Characteristics in the Manufacture and Ripening of Cheese. Chapter in book: *Technology of Cheesemaking*. Blackwell Publishing Ltd, 2010. <https://doi.org/10.1002/978144432740.ch8>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening. Chapter in a book: *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, Boston, MA, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_12
- Lemieux, L., Simard, R.E. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait*, 72(4), 335–385. <https://doi.org/10.1051/lait:1992426>
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot- and commercial-scale productions. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 370–380. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00598.x>
- Yasar, K., Guzeler, N. (2011). Effects of coagulant type on the physicochemical and organoleptic properties of Kashar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 372–379. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00679.x>
- Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., O'Callaghan, D.M., Fox, P.F. (1992). Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. *Lait*, 72(5), 449–459. <https://doi.org/10.1051/lait:1992533>
- Jaros, D., Rohm, H. (2017). Rennets: Applied Aspects. Chapter in a book: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier: Academic Press. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00003-X>
- Dekker, P. (2019). Dairy Enzymes. Chapter in a book: *Industrial Enzyme Applications*. 1st Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., 2019. https://doi.org/10.1002/9783527813780.ch2_3
- Moschopoulou, E. (2017). Microbial Milk Coagulants. Chapter 11 in book: *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. CRC Press. 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315368405-13>
- Myagkonosov, D.S., Smykov, I.T., Abramov, D.V., Delitskaya, I.N., Ovchinnikova, E.G. (2023). Influence of different milk-clotting enzymes on the process of producing semihard cheeses. *Food Systems*, 6(1), 103–116. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-103-116>
- Hayaloglu, A.A. (2007). Comparisons of different single-strain starter cultures for their effects on ripening and grading of Beyaz cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(8), 930–938. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01312.x>
- Visser, S., Slangen, C. J., Robben, A. J. P. M. (1992). Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 599(1–2), 205–209. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85474-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85474-8)
- Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi, M. E. (2005). Rheology, microstructure, and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3052–3062. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72986-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72986-6)
- Montgomery, D. C. (2013). Design and analysis of experiments. Wiley, 2013.
- Jones, B., Nachtsheim, C.J. (2009). Split-plot designs: What, why, and how. *Journal of Quality Technology*, 41(4), 340–361. <https://doi.org/10.1080/00224065.2009.11917790>
- Gorbatova, K.K., Gunkova, P.I. (2010). Biochemistry of milk and milk products. Sankt-Petersburg: GIOR, 2010. (In Russian)
- Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. Chapter in a book: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier: Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Børsting, M. W., Qvist, K. B., Ardö, Y. (2014). Influence of pH on retention of camel chymosin in curd. *International Dairy Journal*, 38(2), 133–135. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.001>
- Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.021>
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1748–1760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
- Bansal, N., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2007). Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(22), 9219–9225. <https://doi.org/10.1021/jf071105p>
- Chitpinitiyol, S., Crabbe, M.D.C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61(4), 395–418.
- Jacob, M. (2011). Milk coagulation enzymes of various origins and their influence on cheese yield and cheese quality. Dissertation. Dresden: Technical University of Dresden, 2011. Retrieved from <https://d-nb.info/1067190643/34> Accessed March 01, 2023. (In German)
- Lee, K.-P. D., Warthesen, J.J. (1996). Preparative methods of isolating bitter peptides from cheddar cheese. (1996). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 1058–1063. <https://doi.org/10.1021/jf950521j>
- Lee, K.D., Lo, C.G., Warthesen, J.J. (1996). Removal of bitterness from the bitter peptides extracted from cheddar cheese with peptidases from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11. *Journal of Dairy Science*, 79(9), 1521–1528. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76512-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76512-8)
- Bansal, N., Drake, M.A., Piraino, P., Broe, M.L., Harboe, M., Fox, P.F. et al. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 19(9), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.010>
- Claverie-Martin, F., Vega-Hernández, M.C. (2007). Aspartic Proteases Used in Cheese Making. Chapter in a book: *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht, 2007. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_13
- Roohi, Zaheer, M.R., Gupta, A. (2019). Current Development and Future Perspectives of Microbial Enzymes in the Dairy Industry. Chapter in book: *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00017-7>
- Emmons, D. B., Reiser, B., Giroux, R. N., Stanley, D. W. (1976). Cheddar cheese made with bovine pepsin. I. Yield and quality of cheese. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 9(4), 189–200. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(76\)73674-5](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(76)73674-5)
- Tunick, M.H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science*, 83(8), 1892–1898. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75062-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75062-4)
- Lamichhane, P., Sharma, P., Kennedy, D., Kelly, A.L., Sheehan, J.J. (2019). Microstructure and fracture properties of semi-hard cheese: Differentiating the effects of primary proteolysis and calcium solubilization. *Food Research International*, 125, Article 108525. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108525>
- O'Mahony, J.A., Lucey, J.A., McSweeney, P.L.H. (2005). Chymosin — mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88, 3101–3114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72992-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72992-1)
- McAuliffe, L.N., Kilcawley, K.N., Sheehan, J.J., McSweeney, P.L.H. (2016). Manufacture and incorporation of liposome-entrapped ethylenediaminetetraacetic acid into model miniature Gouda-type cheese and subsequent effect on starter viability, pH, and moisture content. *Journal of Food Science*, 81(11), C2708–C2712. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13519>
- Moynihan, A. C., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., Lucey, J. A., McSweeney, P. L. H. (2014). Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 85–96. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7081>
- Soltani, M., Boran, O.S., Hayaloglu, A.A. (2016). Effect of various blends of camel chymosin and microbial rennet (*Rhizomucor miehei*) on microstructure and rheological properties of Iranian UF White cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 724–728. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.028>
- Tunick, M.H., Nolan, E.J., Shieh, J.J., Basch, J.J., Thompson, M.P., Maleeff, B.E. et al. (1990). Cheddar and Cheshire cheese rheology. *Journal of Dairy Science*, 73(7), 1671–1675. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78841-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78841-8)
- Myagkonosov, D. S., Smykov, I. T., Abramov, D. V., Delitskaya, I. N., Ovchinnikova, E. G. (2021). Influence of milk-clotting enzymes of animal and microbial origin on the quality and shelf life of soft cheeses. *Food Systems*, 4(4), 286–293. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-4-286-293> (In Russian)
- Myagkonosov, D. S., Abramov, D. V., Delitskaya, I. N., Bukharina, G. B. (2022). Effect of the recombinant chymosins of different origins on the quality and shelf life of soft cheeses. *Food Systems*, 5(3), 239–248. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-3-239-248>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Bansal, N., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2009). Comparison of level of residual coagulant activity in different cheese varieties. *Journal of Dairy Research*, 76(3), 290–293. <https://doi.org/10.1017/S0022029909004075>
- Soodam, K., Ong, L., Powell, I.B., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2015). Effect of rennet on the composition, proteolysis and microstructure of reduced-fat cheddar cheese during ripening. *Dairy Science and Technology*, 95(5), 665–686. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0250-5>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2017). Cheese: Structure, Rheology and Texture. Chapter in a book: *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7
- Guinee, T.P., O'Callaghan, D.J. (2010). Control and Prediction of Quality Characteristics in the Manufacture and Ripening of Cheese. Chapter in book: *Technology of Cheesemaking*. Blackwell Publishing Ltd, 2010. <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch8>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening. Chapter in a book: *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, Boston, MA, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_12
- Lemieux, L., Simard, R.E. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait*, 72(4), 335–385. <https://doi.org/10.1051/lait:1992426>
- Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot- and commercial-scale productions. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 370–380. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00598.x>
- Yasar, K., Guzel, N. (2011). Effects of coagulant type on the physicochemical and organoleptic properties of Kashar cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 372–379. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00679.x>
- Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., O'Callaghan, D.M., Fox, P.F. (1992). Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. *Lait*, 72(5), 449–459. <https://doi.org/10.1051/lait:1992533>
- Jaros, D., Rohm, H. (2017). Rennets: Applied Aspects. Chapter in a book: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier: Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00003-X>
- Dekker, P. (2019). Dairy Enzymes. Chapter in a book: *Industrial Enzyme Applications*. 1st Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., 2019. https://doi.org/10.1002/9783527813780.ch2_3
- Moschopoulou, E. (2017). Microbial Milk Coagulants. Chapter 11 in book: *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. CRC Press, 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315368405-13>
- Myagkonosov, D.S., Smykov, I.T., Abramov, D.V., Delitskaya, I.N., Ovchinnikova, E.G. (2023). Influence of different milk-clotting enzymes on the process of producing semihard cheeses. *Food Systems*, 6(1), 103–116. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-103-116>
- Hayaloglu, A.A. (2007). Comparisons of different single-strain starter cultures for their effects on ripening and grading of Beyaz cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(8), 930–938. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01312.x>
- Visser, S., Slangen, C. J., Robben, A. J. P. M. (1992). Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 599(1–2), 205–209. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85474-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85474-8)
- Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi, M. E. (2005). Rheology, microstructure, and functionality of low-fat Iranian white cheese made with different concentrations of rennet. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3052–3062. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72986-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72986-6)
- Montgomery, D. C. (2013). Design and analysis of experiments. Wiley, 2013.
- Jones, B., Nachtsheim, C.J. (2009). Split-plot designs: What, why, and how. *Journal of Quality Technology*, 41(4), 340–361. <https://doi.org/10.1080/00224065.2009.11917790>
- Горбатова, К.К., Гунькова, П. И. Биохимия молока и молочных продуктов. СПб.: ГИОРД, 2010.
- Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. Chapter in a book: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier: Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Børsting, M. W., Øvst, K. B., Ardö, Y. (2014). Influence of pH on retention of camel chymosin in curd. *International Dairy Journal*, 38(2), 133–135. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.001>
- Wilkinson, M.G., Kilcawley, K.N. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.021>
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K., Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1748–1760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
- Bansal, N., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2007). Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(22), 9219–9225. <https://doi.org/10.1021/jf071105p>
- Chitpintyol, S., Crabbe, M.D.C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61(4), 395–418.
- Jacob, M. (2011). Milk coagulation enzymes of various origins and their influence on cheese yield and cheese quality. Dissertation. Dresden: Technical University of Dresden, 2011. Retrieved from <https://d-nb.info/1067190643/34> Accessed March 01, 2023. (In German)
- Lee, K.-P.D., Warthesen, J. J. Preparative Methods of Isolating Bitter Peptides from Cheddar Cheese. (1996). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 1058–1063. <https://doi.org/10.1021/jf950521j>
- Lee, K.D., Lo, C.G., Warthesen, J.J. (1996). Removal of bitterness from the bitter peptides extracted from cheddar cheese with peptidases from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11. *Journal of Dairy Science*, 79(9), 1521–1528. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76512-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76512-8)
- Bansal, N., Drake, M.A., Piraino, P., Broe, M.L., Harboe, M., Fox, P.F. et al. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 19(9), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.010>
- Claverie-Martin, F., Vega-Hernández, M.C. (2007). Aspartic Proteases Used in Cheese Making. Chapter in a book: *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht, 2007. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_13
- Roohi, Zaheer, M.R., Gupta, A. (2019). Current Development and Future Perspectives of Microbial Enzymes in the Dairy Industry. Chapter in book: *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00017-7>
- Emmons, D. B., Reiser, B., Giroux, R. N., Stanley, D. W. (1976). Cheddar cheese made with bovine pepsin. I. Yield and quality of cheese. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 9(4), 189–200. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(76\)73674-5](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(76)73674-5)
- Tunick, M.H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science*, 83(8), 1892–1898. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75062-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75062-4)
- Lamichhane, P., Sharma, P., Kennedy, D., Kelly, A.L., Sheehan, J.J. (2019). Microstructure and fracture properties of semi-hard cheese: Differentiating the effects of primary proteolysis and calcium solubilization. *Food Research International*, 125, Article 108525. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108525>
- O'Mahony, J.A., Lucey, J.A., McSweeney, P.L.H. (2005). Chymosin — mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3101–3114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72992-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72992-1)
- McAuliffe, L.N., Kilcawley, K.N., Sheehan, J.J., McSweeney, P.L.H. (2016). Manufacture and incorporation of liposome-entrapped ethylenediaminetetraacetic acid into model miniature Gouda-type cheese and subsequent effect on starter viability, pH, and moisture content. *Journal of Food Science*, 81(11), C2708–C2712. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13519>
- Moynihan, A. C., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., Lucey, J. A., McSweeney, P. L. H. (2014). Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 85–96. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7081>
- Soltani, M., Boran, O.S., Hayaloglu, A.A. (2016). Effect of various blends of camel chymosin and microbial rennet (*Rhizomucor miehei*) on microstructure and rheological properties of Iranian UF White cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 724–728. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.028>
- Tunick, M.H., Nolan, E.J., Shieh, J.J., Basch, J.J., Thompson, M.P., Maleeff, B.E. et al. (1990). Cheddar and Cheshire cheese rheology. *Journal of Dairy Science*, 73(7), 1671–1675. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78841-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78841-8)
- Мягконосов, Д.С., Смыков, И.Т., Абрамов, Д.В., Делицкая, И.Н., Овчинникова, Е.Г. (2021). Влияние молокосвертывающих ферментов животного и микробного происхождения на качество и срок хранения мягких сыров. *Пищевые системы*, 4(4), 286–293. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-4-286-293>
- Myagkonosov, D. S., Abramov, D. V., Delitskaya, I. N., Bukcharina, G. B. (2022). Effect of the recombinant chymosins of different origins on the quality and shelf life of soft cheeses. *Food Systems*, 5(3), 239–248. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-3-239-248>

AUTHOR INFORMATION	СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ
Affiliation	Принадлежность к организации
Dmitry S. Myagkonosov, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Head of Research Department in Applied Biochemistry and Enzymology, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7–915–973–63–13 E-mail: d.myagkonosov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * corresponding author	Мягконос Дмитрий Сергеевич — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления исследований по прикладной биохимии и энзимологии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7–915–973–63–13 E-mail: d.myagkonosov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * автор для контактов
Dmitry V. Abramov, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Head of Biochemical Research in Cheesemaking and Buttermaking, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7–910–970–42–97 E-mail: d.abramov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932	Абрамов Дмитрий Васильевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления биохимических исследований по сыроделию и маслоделию, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7–910–970–42–97 E-mail: d.abramov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932
Irina N. Delitskaya, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Department of Cheesemaking, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7–48532–98–1–28 E-mail: i.delitskaya@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3587-4050	Делицкая Ирина Николаевна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, отдел сыроделия, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7–48532–98–1–28 E-mail: i.delitskaya@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3587-4050
Galina B. Bukcharina, Junior Researcher, Department of Physical Biochemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7–48532–98–1–22 E-mail: g.bukcharina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4061-363X	Бухарина Галина Борисовна — младший научный сотрудник, отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7–48532–98–1–22 E-mail: g.bukcharina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4061-363X
Contribution	Критерии авторства
Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.	Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.
Conflict of interest	Конфликт интересов
The authors declare no conflict of interest.	Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-488-496>

Поступила 07.06.2023

Поступила после рецензирования 24.11.2023

Принята в печать 28.11.2023

© Цырендоржиева С. В., Жамсаранова С. Д., Баженова Б. А., Хамаганова И. В., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

БАДАН ТОЛСТОЛИСТНЫЙ КАК АЛЬТЕРНАТИВА СИНТЕТИЧЕСКИМ КРАСИТЕЛЯМ ДЛЯ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ

Цырендоржиева С. В.^{1,*}, Жамсаранова С. Д.^{1,2}, Баженова Б. А.¹, Хамаганова И. В.¹

¹ Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

² Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

бадан
толстолистный,
состав, пигменты,
каротиноиды,
спектры
флуоресценции

Актуальность изучения синтетических красителей и возможности их строго регламентированного применения связана с возрастающим интересом производителей к натуральным пищевым красителям ввиду стремления придать пищевым продуктам статус натуральных. В работе получены новые данные о содержании фотосинтетических пигментов в листьях бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch, произрастающего в Республике Бурятия, с разными сроками вегетации. Показано, что это одно из немногих растений, листья которого содержат значительное количество каротиноидов. Максимальное суммарное их количество отмечено в красных листьях бадана — $1257,9 \pm 33,1$ ммоль/моль хлорофилла. Выявлены сезонные изменения комплекса фотосинтетических пигментов в листьях. Так, содержание хлорофиллов в черных листьях снижалось в 4 раза по сравнению с числом пигментов в зеленых листьях. Незначительные потери фонда зеленых пигментов наблюдались и в красных листьях. В черных листьях оставалось около 18% хлорофиллов. В период после выхода растений из-под снега содержание хлорофилла α увеличилось в 3 раза, а хлорофилла β — в 1,8 раза. В листьях бадана в составе каротиноидов обнаружен β -каротин (30% суммы каротиноидов). В преобладающем количестве из числа ксантофилловых пигментов отмечен лютеин, на долю которого приходилось до 51% суммы каротиноидов.

БЛАГОДАРНОСТИ: работа выполнена на оборудовании и приборах лабораторий Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления.

Received 07.06.2023

Accepted in revised 24.11.2023

Accepted for publication 28.11.2023

© Tsyrendorzhieva S. V., Zhamsaranova S. D., Bazhenova B. A., Khamaganova I. V., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

LEATHER BERGENIA AS AN ALTERNATIVE TO SYNTHETIC COLORANTS FOR FOOD SYSTEMS

Svetlana V. Tsyrendorzhieva^{1,*}, Sesegma D. Zhamsaranova^{1,2}, Bayana A. Bazhenova¹, Inga V. Khamaganova¹

¹ East Siberian State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia

² Buryat State University, Ulan-Ude, Russia

KEY WORDS:
leather bergenia,
composition,
pigments, carotenoids,
fluorescence spectra

ABSTRACT

The topicality of studying synthetic colorants and a possibility of their strictly regulated application is linked with an increasing producers' interest in natural food colorants due to the attempt to grant the status of natural products to foods. New data on the content of photosynthetic pigments in leaves of leather bergenia (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch) of different periods of vegetation growing in the Republic of Buryatia were obtained in this work. It is shown that it is one of the few plants, which leaves contain a significant amount of carotenoids. Their maximum total content (1257.9 ± 33.1 mmol/mol chlorophyll) was noticed in red leaves of bergenia. Seasonal changes in the complex of photosynthetic pigments in leaves were revealed. For example, the content of chlorophylls in black leaves reduced by four times compared to the amount of pigments in green leaves. Insignificant losses of the pool of green pigments were also observed in red leaves. About 18% of chlorophylls remained in black leaves. During the period after plants' appearance from under the snow, the content of chlorophyll α increased by 3 times and chlorophyll β by 1.8 times. In leaves of bergenia, β -carotene was found in the composition of carotenoids (30% of the sum of carotenoids). Among xanthophyllic pigments, lutein was found in the prevailing quantity; its proportion accounted for 51% of the sum of carotenoids.

ACKNOWLEDGEMENTS: The work was carried out on the equipment and instruments of the laboratories of the East Siberian State University of Technology and Management.

1. Введение

В настоящее время во всем мире испытывается потребность в высококачественных, безопасных для человека красителях, обеспечение которой обусловлено значительной индустриализацией сферы общественного питания, в особенности детского и диетического, а также изменением вкусов потребителей.

Объем производства и ассортимент натуральных красителей ограничены, в связи с чем потребность в них покрывается за счет красителей синтетического происхождения [1,2]. Безусловно, разработка новых технологий изготовления естественных природных красителей и совершенствование существующих являются приоритетным направлением исследований в этой области.

В соответствии с Техническим регламентом Таможенного союза ТР ТС 029/2012¹ «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств», при изготовлении пищевых продуктов предъявляются серьезные требования ко всем пищевым добавкам и в том числе к натуральным красителям пищевого происхождения. Одним из требований к производству натуральных красителей является отсутствие отрицательного влияния на пищевую ценность изделий и сохранение окраски на протяжении

¹ Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» (с изменениями на 18 сентября 2014 года). Принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 20 июля 2012 года № 58.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Цырендоржиева, С. В., Жамсаранова, С. Д., Баженова, Б. А., Хамаганова И. В. (2023). Бадан толстолистный как альтернатива пищевым красителям для пищевых систем. Пищевые системы, 6(4), 488–496. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-488-496>

FOR CITATION: Tsyrendorzhieva, S. V., Zhamsaranova, S. D., Bazhenova, B. A., Khamaganova, I. V. (2023). Leather bergenia as an alternative to synthetic colorants for food systems. Food Systems, 6(4), 488–496. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-488-496>

сроков годности, которые установлены нормативными документами. По этой причине основной задачей специалистов, работающих в области изучения и производства пищевых красителей, является разработка новых торговых препаратов красителей с повышенной световой и температурной устойчивостью.

Главный источник натуральных красителей — растительное сырье, в том числе нетрадиционное. Красящие вещества обычно выделяют из различных частей растений, окраска которых обусловлена присутствием в них антоцианов, каротиноидов, флавоноидов, хлорофиллов и др. [3,4].

Одним из перспективных объектов изучения является бадан толстолистный *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch — травянистый вечнозеленый многолетник семейства камнеломковых. Благодаря наличию широкого спектра химических соединений бадан толстолистный с давних пор использовался в качестве лекарственного растения в народной, в частности тибетской и монгольской медицине. Противовоспалительные, мощные антимикробные, мочегонные, адаптогенные и другие свойства бадана лежат в основе лечения разных заболеваний. При оценке иммунокорректирующих свойств черных листьев бадана толстолистного установлено их благотворное влияние на все звенья иммунной защиты [5].

Корневища и листья бадана содержат фенольные соединения, флавоноиды, каротиноиды, кумарины, арбутин, витамины, благодаря которым препараты из бадана проявляют противовоспалительное, антимикробное, противоопухолевое и адаптогенное действия [6,7].

Бадан толстолистный растет повсеместно в прибрежной зоне Байкала на затемненных влажных склонах в сосновых, кедрово-пихтовых, березово-сосновых горных лесах, поселяется на сухих солнечных склонах, нормально переносит условия каменистых берегов горных рек. Достаточная обеспеченность Республики Бурятия сырьевыми запасами бадана не вызывает сомнения. Общая площадь бадановых зарослей на территории Бурятии занимает 600 тыс. га при средней урожайности сырых листьев 2,5, а корневищ — 2,1 кг/м² [6].

Особый интерес к бадану в качестве перспективного растения для создания лекарственных препаратов с заданными фармакологическими свойствами, а также пищевых добавок и напитков обусловлен широким спектром его биологической активности. Для использования в медицинских целях в основном изучаются только корневища растения, хотя большее количество каротина, флавоноидов и аскорбиновой кислоты содержится в листьях бадана [7,8]. При этом в большинстве случаев исследуется химический состав зеленых листьев бадана, в то время как в красных или черных листьях растения присутствует не меньше фармакологически активных соединений.

Такие растительные пигменты, как хлорофилл, флавоноиды, каротиноиды и антоцианы, содержащиеся в бадане, и их различные соотношения обуславливают цвет растения от зеленого до темно-коричневого, а также принимают активное участие в процессах фотосинтеза в листьях. Нельзя не отметить, что перечисленные пигменты являются безвредными натуральными красителями, представляющими интерес не только для пищевой, но и для косметической промышленности. Одновременно с этим они могут быть использованы в медицине в качестве иммуностимуляторов и при создании новых диагностических препаратов [9].

Антоцианы не только играют важную роль в жизни растений, но и представляют пользу для организма людей и животных, что подтверждается современными научными данными. К примеру, ингибирование антоцианами различных форм рака, метаболических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний было задокументировано как на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, так и в клинических и эпидемиологических исследованиях [10]. Какое-то время предполагалось, что за укрепляющие здоровье эффекты ответственен только антиоксидантный эффект антоцианов, однако ученые доказали способность этих пигментов взаимодействовать с регуляторными белками, а также с компонентами сигнальных путей и, таким образом, модулировать протекающие в организме человека физиологические процессы [11].

Следует подчеркнуть, что лидерами по содержанию антоцианов являются темноокрашенные плоды, среди которых ягоды бузины, рябины черноплодной, граната и черники [12]. По мнению Юдиной и др., в последнее время в качестве источников антоцианов стали рассматривать более «экзотические» в этом плане культуры, такие как злаки и картофель, зерно и клубни которых также способны накапливать антоциановые вещества [13].

Повышается интерес и к каротиноидам среди естественных пигментов, которые, несомненно, занимают лидирующую позицию, а по своей антиоксидантной активности превосходят традиционные антиоксиданты аскорбаты и токоферолы в десятки и сотни раз [4].

Литературные данные свидетельствуют о широком спектре лечебно-профилактического действия каротиноидов, обусловленного главным образом защитой от окислительного стресса [14]. Антиоксидантный эффект целого ряда каротиноидов обеспечивает их радиопротекторное, антимуtagenное, иммуномодулирующее, антиинфекционное, антиканцерогенное действия. Исследования последних лет показали, что астаксантин (3,3'-дигидрокси-β, β'-каротин-4,4'-дион), синтезируемый морской микроводорослью *Haematococcus pluvialis* Flotow, оказывается антиоксидантом, более эффективным по сравнению с такими известными акцепторами свободных радикалов, как α-токоферол (витамин Е), β-каротин, ликопин, лютеин и др. [15]. Другим важным открытием, с точки зрения ряда ученых [16], явилось подтверждение важной функции лютеина и зеаксантина (дигидроксипроизводных α- и β-каротинов соответственно) в предотвращении возрастной потери зрения.

Широкое применение каротиноидов наблюдается не только в медицине, но и в пищевой промышленности. Так, например, β-каротин используют при изготовлении лекарств и косметических средств [17], а также в сочетании с ликопином применяют в технологиях пищевых продуктов как пигментные вещества и красители. В особенности велико значение ликопина, заменяющего нитрит натрия при изготовлении колбас и ветчинных изделий [18]. В качестве натурального красителя используют β-апо-8-каротиналь, который придает оранжевую окраску леденцам, пищевым пастам, кексам и др. [19]. В европейских странах по большей части β-каротин применяют для подкрашивания сливочного масла и макаронных изделий. β-Каротин и β-апо-8-каротиналь добавляют также в сыры и овощные пасты [20]. Известен тот факт, что каротиноиды в комплексе с аскорбиновой кислотой усиливают стабильность пигментов [21].

Вне всякого сомнения, каротиноиды играют важную роль в фотосинтезе. Каротиноидные красители в разных концентрациях присутствуют у всех фотосинтезирующих организмов в виде оранжевых, желтых и красных пигментов и принимают участие в поглощении и переносе световой энергии, защите фотосинтетического аппарата.

Целебные свойства хлорофилла, обладающего широким положительным спектром действия на организм, известны человечеству на протяжении многих веков. Это вещество способствует повышению обмена веществ и уровня гемоглобина, улучшению тонуса сосудов и перистальтики кишечника, а также оказывает бактерицидное действие. По некоторым литературным источникам, хлорофилл также активизирует работоспособность иммунной системы организма, ускоряя фагоцитоз, усиливает работу ферментов, участвующих в синтезе витаминов А, Е и К и в работе желез эндокринной системы [22]. Большинство проведенных исследований свидетельствуют о том, что хлорофилл предупреждает развитие раковых заболеваний, прежде всего кишечника [23].

В эколого-физиологических исследованиях содержание хлорофилла используется как один из показателей фотосинтетической способности листа. С точки зрения некоторых ученых, окраска листьев зеленых растений зависит от присутствия в них доминирующих пигментов — хлорофиллов, пропускающих или отражающих зеленые лучи. По мнению автора работы [24] именно хлорофилл выполняет функцию главного фоторецепторного красящего вещества в фотосинтезе. В листьях хлорофилл содержится в виде воскоподобных веществ и составляет от 0,6 до 1,2% от сухой массы. Нельзя не отметить, что структура молекулы хлорофилла в лучшем виде адаптирована для выполнения основных функций в фотосинтезе — поглощения, запасаения и преобразования энергии [24]. Не исключено, что инструментом многообразных эффектов хлорофилла является упрощение процессов переноса зарядов, в том числе биологически активного вещества на соответствующую мишень или рецептор и сопутствующее УФ-излучение при объединении свободных радикалов или в других реакциях [4].

Важно отметить, что совокупная деятельность хлорофиллов и каротиноидов способствует эффективному использованию световой энергии при фотосинтезе. В последние годы появились сообщения [25] (и их становится все больше) о том, что величины значений пигментного комплекса характеризуют функциональное состояние растений, определяют потенциальную возможность фотосинтетического аппарата и служат указателем (биоиндикатором) эффективности фотосинтеза.

Итак, согласно современным представлениям, пигменты занимают центральное место в фотосинтезе, без них невозможно поглощение и запасаение световой энергии. К настоящему времени хорошо исследованы фотосинтетические функции пигментного комплекса. Вместе с тем количественная оценка содержания и качественный состав пигментов, а также изменение их соотношений в растениях являются важным и чувствительным показателем их физиологиче-

ского состояния и фотосинтетического аппарата. Поэтому основной целью нашей работы было исследование содержания фотосинтетических пигментов листьев бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch, собранных в разные периоды вегетации.

2. Объекты и методы

Для проведения экспериментов сбор листьев бадана толстолистного осуществляли в мае–июне 2020–2022 гг., в это время года *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch характеризуется одновременным присутствием на растении зеленых, красных и черных листьев в силу особенностей циклического развития. Собранные листья разных фаз развития сушили в естественных условиях до воздушно-сухого состояния, упаковывали в бумажные пакеты и хранили в темном месте. Выделение биологически активных веществ из листьев бадана проводили в сырье, измельченном до размера частиц не более 1 мм.

При изучении химического состава листьев бадана были изучены следующие показатели: содержание влаги — в соответствии с ГОСТ 28561–90²; содержание золы — по общепринятой методике; общий азот — по методу Кьельдаля; содержание углеводов — массовые доли редуцирующих сахаров, общего сахара, сахарозы — по ГОСТ 8756.13–87³; содержание комплекса фенольных соединений — спектрофотометрическим методом.

Для выявления количественного содержания пигментов в растительном сырье использовали спектрофотометрический метод [26], который основан на извлечении хлорофиллов и каротиноидов из растительной ткани ацетоном, на очистке экстракта и на измерении оптической плотности растворов смеси в диапазоне длин волн 400–700 нм. Определение хлорофилла осуществляли в области их красных максимумов поглощения, при анализе общих каротиноидов использовали синюю область спектра. Для обнаружения фотосинтетических пигментов растительный материал заливали кипящим 100%-ным ацетоном. До начала экстракции пигментов и анализа образцы хранили в темном и холодном месте при 5 °С.

Содержание хлорофиллов и каротиноидов определяли на спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Япония) в ацетоновой вытяжке при длинах волн 662 и 644 нм для хлорофилла α и β соответственно. Определение каротиноидов проводили при длине волны 478 нм. Долю хлорофиллов, входящих в светособирающий комплекс, рассчитывали по формуле: $[(X_{\lambda\beta} + 1,2 X_{\lambda\alpha}) / (X_{\lambda\alpha} + X_{\lambda\beta})]$, исходя из того, что весь $X_{\lambda\beta}$ находится в светособирающем комплексе фотосистемы II, а соотношение $X_{\lambda\alpha}/X_{\lambda\beta}$ в этом комплексе составляет 1,2.

Индивидуальные каротиноиды разделяли методом высокоэффективной хроматографии в соответствии с модифицированным методом [27]. Комплект для ВЭЖХ состоял из следующего оборудования: насос для ВЭЖХ — HPLC Pump 1000 (Knauer, Германия), рефрактометрический детектор — Smartline UV Detector 2500 (Knauer, Германия), аналитическая колонка — 4,0 × 250 мм Диасфер-110-С₁₈ NT с размером частиц 5 мкм («БиоХимМак», Россия).

Фрагменты листовых пластинок растирали в 100%-ном ацетоне и отфильтровывали. Подготовленный экстракт пигментов с помощью микрошприца наносили на колонку. Элюирование пигментов проводили при градиентном режиме в течение 34 мин в системе элюентов А и В (метанол: этилацетат в соотношении 68:32) со скоростью потока 2 см³/мин. Температура хроматографирования — 25 °С. Пигменты демодулировали при длине волны 440 нм. Для расчета количественного состава пигментов был использован метод внешнего стандарта, который заключается в определении калибровочных коэффициентов для расчета концентраций веществ путем предварительного ввода в аналитическую систему стандартных растворов определяемых компонентов. Для распознавания каротиноидов применяли стандарты чистых веществ и времена удержания. Обработку хроматографических значений выполняли с помощью компьютерного программного обеспечения EuroChrom for Windows.

Для приготовления исходных стандартных растворов, содержащих 1 мг (β -каротин) и 0,1 мг (лютеин, зеаксантин) вещества в 1 см³ раствора, соответствующие каротиноиды переводили в раствор добавлением гексана (для β -каротина) и 100%-ного ацетона (для лютеина и зеаксантина). Хроматографические измерения эталонировали методом абсолютной градуировки, который заключается в построении графической зависимости одного из количественных параметров хроматографического пика от содержания вещества в пробе. Градуировочные кривые построены отдельно для каждого пигмента, повторность трехкратная.

Спектры низкотемпературной флуоресценции листьев, хлоропластов и выделенных фракций измеряли при 77К на спектрофлуориметре (Hitachi-850, Япония) в диапазоне от 650 до 800 нм при возбуждении флуоресценции длиной волны, равной 435 нм и близкой к максимуму поглощения Хл а (440 нм).

Экспериментальные данные обрабатывали, вычисляя стандартную ошибку и доверительный интервал. Каждый результат показан как среднее значение из минимум трех независимых экспериментов $\pm \Delta$ (стандартная ошибка среднего). Достоверность различий оценивали согласно t-критерию Стьюдента, различия считались значимыми при $p < 0,05$. Статистическая и математическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel, при этом статистическая ошибка не превышала 1–3% от определяемой величины.

3. Результаты и обсуждение

В данной статье рассмотрены вопросы влияния фазы развития листьев бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch на содержание биологически активных веществ и на формирование фотосинтетических пигментов в надземной части бадана толстолистного (Рисунок 1).



Рисунок 1. Бадан толстолистный *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch, произрастающий в регионе Республики Бурятия
Figure 1. Leather bergenia (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch) growing in the region of the Republic of Buryatia

Изображение надземной части бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch, представленное на Рисунке 1, свидетельствует о том, что на растении одновременно находятся листья разного цвета, то есть разной фазы развития. Особенность бадана заключается в том, что у многолетнего растения перезимовавшие красные и черные листья выходят из-под снега именно в таком виде, а в течение летнего сезона нарастает вегетативная зеленая масса, поэтому сбор объектов исследования осуществляли в мае–июне.

Фазы развития надземной части бадана характеризуются цветом листьев: зеленые листья, которые формируются в первый или второй год, красные — на третий или четвертый, черные — на четвертый–пятый год (Рисунок 2).

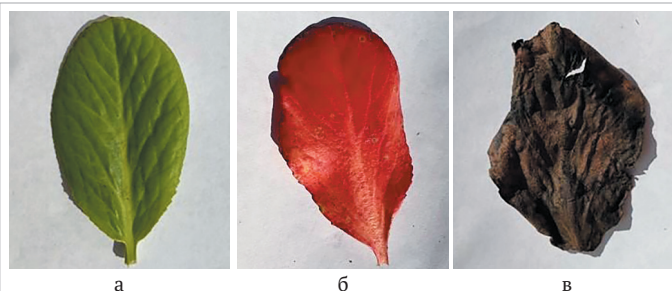


Рисунок 2. Листья бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch разной фазы развития (а – зеленые второго года развития, б – красные третьего года развития, в – черные четвертого года развития)

Figure 2. Leaves of leather bergenia (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch) in different development phases (a – green of the second year of the development, б – red of the third year of the development, в – black of the fourth year of the development)

² ГОСТ 28561–90 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения сухих веществ или влаги». М.: Стандартинформ, 2011. — 11 с.

³ ГОСТ 8756.13–87 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения. Методы определения сахаров». М.: Стандартинформ, 2010. — 12 с.

Данные Рисунка 2 показывают выраженное изменение окраски листьев в зависимости от фазы развития, что может свидетельствовать о сезонной динамике биологически активных веществ, в том числе пигментсодержащих.

Как показал обзор литературы, химический состав и ценность бадана представляют интерес для ученых разных отраслей (биологической, фармацевтической, пищевой и др.). В зависимости от цели исследований изучаются надземная, подземная части бадана в разной стадии развития. Малоизученным остается вопрос количественной оценки содержания и качественного состава пигментов листьев бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch в различной фазе развития. В связи с этим в данной статье рассмотрены вопросы формирования фотосинтетических пигментов листьев бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch, собранных в разные периоды вегетации.

На первом этапе была изучена сезонная динамика химического состава в листьях бадана толстолистного (разного цвета) (Рисунок 3).

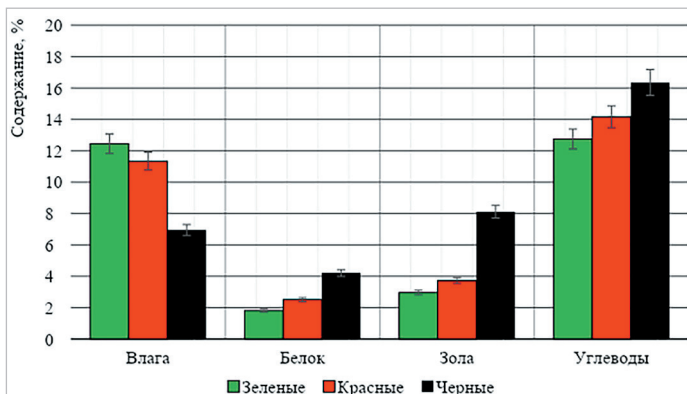


Рисунок 3. Сезонная динамика химического состава листьев бадана толстолистного

Figure 3. Seasonal dynamics of the chemical composition of leaves of leather bergenia

Количественным определением содержания биологически активных веществ в листьях бадана с разной фазой развития установлено, что содержание влаги в зеленых и красных листьях бадана толстолистного примерно одинаковое и составляет 12,45% и 11,34%, разница несущественна, так как $p > 0,05$. Можно отметить достоверно более низкое содержание влаги в черных листьях (6,95%) по сравнению с его содержанием в зеленых в 1,8 раза и в красных в 1,6 раза ($p < 0,05$). Четырехгодовые сезонные воздействия и ферментативная активность веществ вызывают потерю тургора черных листьев, затем подсушивание и высушивание, что объясняет низкое содержание влаги в черных листьях.

Белковые вещества, содержащиеся в листьях, составляют в зеленых листьях 1,82%, в красных — 2,51%, в черных — 4,21%. Разница между значениями достоверна, так как $p < 0,05$. В процессе вегетации и созревания в течение нескольких лет происходит накопление белковых веществ бадана толстолистного, в состав которых входят в том числе хлорофиллы. Также обезвоживание листьев бадана вызывает увеличение массовой доли сухих веществ в черных листьях бадана. Содержание золы, которое характеризует долю минеральных веществ, составляет в зеленых и красных листьях 2,96 и 3,72% — отличие недостоверное ($p > 0,05$). В черных листьях содержание золы составило 8,11%, что выше в 2,7 и в 2,2 раза, чем в зеленых и красных листьях соответственно ($p < 0,05$).

Динамика содержания углеводов, в состав которых входят редуцирующие, нередуцирующие и простые сахара, аналогична изменениям в содержании белковых веществ. В черных листьях их значение выше, чем в зеленых и красных листьях ($p < 0,05$).

Далее было исследовано изменение биологически активных веществ, в том числе содержащих пигменты, в зависимости от фазы развития листьев бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch (Таблица 1).

Данные Таблицы 1 свидетельствуют о том, что листья бадана содержат фенолы, общее количество которых составляет свыше 20%. Отмечено, что в красных листьях бадана толстолистного содержание фенолов выше в 1,5 раза, в черных — в 1,7 раза по сравнению с их количеством в зеленых листьях. В процессе вегетации, развития и биохимических изменений наблюдается накопление в надземной части бадана биологически активных веществ, в том числе фенолов.

Таблица 1. Влияние фазы развития листьев бадана толстолистного на содержание биологически активных веществ, в том числе содержащих пигменты

Table 1. Effect of the development phase of leaves of leather bergenia on the content of biologically active substances including substances containing pigments

Биологически активные вещества	Виды листьев		
	Зеленые листья	Красные листья	Черные листья
Общее содержание фенолов, %	21,45 ± 0,18*	32,63 ± 0,12*	36,42 ± 0,09*
Сумма каротиноидов, ммоль/моль хлорофилла	820,65 ± 20,21*	2524,12 ± 52,34*	2259,27 ± 64,13*

Примечание: * различия в значениях, указанных в строках, статистически достоверны ($p < 0,05$).

Суммарное содержание каротиноидов, представленное в Таблице 1, показало, что их значение выросло в красных листьях по сравнению с зелеными почти в три раза. Незначительное снижение числа каротиноидов в черных листьях бадана, возможно, обусловлено частичным обновлением ресурса хлорофиллов.

Полученные по химическому составу выводы согласуются с данными исследований других авторов [5,7]. Представленные результаты позволяют рассматривать листья бадана в качестве пищевого растительного компонента, богатого источника биологически активных веществ, а в связи с высоким содержанием компонентов, содержащих красящие пигменты (фенольные соединения, каротиноиды и др.), листья бадана толстолистного могут играть роль натурального красителя в пищевых системах: мясных, хлебобулочных, кондитерских и т. д.

Анализ исследований в области состава и свойств листьев бадана показал, что многие природные красящие вещества обладают не только антиоксидантными свойствами, но и значительной физиологической и антибиотической активностью [2]. Поэтому использование естественных пигментов для окрашивания продуктов питания позволяет улучшить внешний вид [28], и повысить их пищевую ценность.

Основополагающей функцией растений является фотосинтез. Фотосинтетическая активность листа тесно связана со структурой листа [29]. Сведения о структурно-функциональных преобразованиях фотосинтетического аппарата продолжительно вегетирующих травянистых растений, зимующих под снежным покровом, немногочисленны. По мнению Дымовой О. В. [30], зимующие листья *Ajuga reptans* теряли значительную часть фотосинтетических пигментов, но сохраняли способность ассимилировать CO_2 в весенний период после таяния снега. Авторами в работе [31] отмечено, что функциональная активность фотосинтетического аппарата хвои растений *Picea obovata*, *Abies sibirica* и *Juniperus communis* полностью восстанавливается в июне.

На основании результатов изучения химического состава бадана, свидетельствующего о содержании в нем красящих пигментов, на следующем этапе были исследованы сезонные изменения хлорофиллов листьев, дающих характеризующее состояние пигмент-белковых комплексов фотосистем травянистого растения бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch. Сезонная динамика содержания пигментов в листьях бадана толстолистного представлена в Таблице 2.

Таблица 2. Сезонная динамика содержания пигментов в листьях бадана, мг/г сухой массы

Table 2. Seasonal dynamics of the pigment content in leaves of leather bergenia, mg/g dry mass

Виды листьев	Хла	Хлβ	Хл(α+β)	Хла /Хлβ	Доля хлорофилла в светособирающем комплексе, %
Зеленые	3,24 ± 0,12*	1,69 ± 0,07*	4,93 ± 0,19*	1,92 ± 0,01*	72,1 ± 0,12*
Красные	0,85 ± 0,05*	0,4 ± 0,02*	1,25 ± 0,07*	2,12 ± 0,01*	69,3 ± 0,09*
Черные	0,58 ± 0,02*	0,28 ± 0,02*	0,86 ± 0,04*	2,07 ± 0,01*	75,2 ± 0,08*

Примечание: * различия в значениях, указанных в столбцах, статистически достоверны ($p < 0,05$).

Зеленые листья, сформированные в начале лета текущего года, характеризовались наибольшим содержанием хлорофиллов, в частности отмечено, что 72,1% присутствующих в их составе хлорофиллов принадлежит светособирающему комплексу фотосистемы II.

Выявлены сезонные изменения ресурса фотосинтетических пигментов в листьях. Так, содержание хлорофиллов в черных листьях бадана уменьшалось почти в 4 раза по сравнению с их количеством в зеленых листьях. Незначительные потери зеленых пигментов наблюдались и в красных листьях. В черных листьях оставалось в среднем 18% хлорофиллов. После выхода растений из-под снега отмечалась в некоторой степени регенерация ресурса зеленых пигментов. На наш взгляд, это происходило за счет синтеза хлорофилла α , содержание которого возрастало в 3 раза, в то время как количество хлорофилла β увеличивалось в 1,8 раза. Летом и весной более 70% содержащихся в листьях хлорофиллов принадлежало светособирающему комплексу фотосистемы II, однако после зимнего периода доля хлорофилла в черных листьях бадана в светособирающем комплексе фотосистемы снизилась в 1,4 раза. По-видимому, это объясняется тем, что низкая фотосинтетическая активность черных (перезимовавших) листьев обусловлена значительными изменениями в состоянии фотосинтетического аппарата, перестройкой пигмент-белковых комплексов фотосистем при подготовке к зимнему периоду и их разрушением под действием неблагоприятных обстоятельств.

Важно отметить, что потеря хлорофилла в красных и черных листьях бадана, которая прослеживается в осенне-зимний период, может подтверждать механизм снижения количества поглощаемой энергии по аналогии поведения подавляющего большинства вечнозелено-листопадных пород. Выявленное нами поздне-осеннее снижение содержания хлорофилла согласуется с исследованиями Овсянникова А. Ю. [32], наблюдавшего резкое уменьшение суммы хлорофиллов в хвое елей в этот период. Так, по данным автора, в ранне-весенний период в хвое елей семейства *P. pungens* и *P. obovata* рост отношения $Hl \alpha / Hl \beta$ происходил за счет большей деструкции хлорофилла β . Учитывая, что практически весь хлорофилл β содержится в светособирающем комплексе фотосистемы II, это указывает на преимущественное выцветание светособирающего комплекса по сравнению с хлорофилл-белковым комплексом фотосистемы II в этот период. Летом максимальные величины отношения хлорофиллов достигались у исследованных видов за счет увеличения синтеза хлорофилла α . Снижение отношения $Hl \alpha / Hl \beta$ ранней осенью определялось замедлением образования хлорофилла α и увеличением содержания хлорофилла β , что характеризует переход от «светового» типа в весенне-летний период к «тенивому» типу организации фотосинтетического аппарата осенью [33].

Исходя из вышесказанного, очевидное сокращение содержания хлорофиллов в черных листьях бадана связано с распадом важных и существенных пигмент-белковых комплексов фотосистем. Нами установлено, что после зимы в черных листьях наблюдалось не в полной мере возобновление ресурса хлорофиллов, в основном за счет увеличения концентрации хлорофилла α как главного пигмента корового комплекса фотосистем. Многие авторы считают, что универсальной структурной единицей обеих фотосистем является коровый комплекс, который представляет собой реакционный центр, окруженный пигментными молекулами, которые образуют прицентровую антенну [34]. Мы также полагаем, что сохранение функциональной активности листьев бадана возникает благодаря структурной перестройке комплексов фотосистемы II и их светособирающих систем II.

Далее были изучены качественный и количественный составы каротиноидов в листьях бадана в зависимости от фазы развития (Таблица 3).

Таблица 3. Сезонная динамика содержания отдельных каротиноидов в листьях бадана, ммоль/моль хлорофилла

Каротиноиды	Зеленые листья	Красные листья	Черные листья
Неоксантин	53,2 ± 14,1*	187,5 ± 11,4*	140,7 ± 10,2*
Виолаксантин	16,07 ± 1,4*	97,96 ± 6,7*	18,24 ± 6,9
Антераксантин	1,4 ± 1,3*	2,06 ± 1,8	6,33 ± 1,7*
Лютеин	209,74 ± 10,5*	721,03 ± 15,9*	572,0 ± 14,7*
Зеаксантин	1,34 ± 1,13*	5,58 ± 1,8	38,0 ± 1,25*
β -каротин	126,3 ± 8,5*	243,67 ± 10,4*	351,65 ± 9,3*
Сумма каротиноидов	408,0 ± 30,2*	1257,9 ± 33,1*	1126,85 ± 31,2*
Вео + Ант + Зеа, % Сумма компонентов ксантофиллового цикла, % от суммы каротиноидов	4,6 ± 1,08*	8,4 ± 1,10*	5,5 ± 0,53

Примечание: *различия в значениях, указанных в строках, статистически достоверны ($p < 0,05$)

Данные Таблицы 3 показали, что в листьях бадана в составе каротиноидов присутствуют β -каротин (30% суммы каротиноидов) и ксантофиллы (лютеин, неоксантин, виолаксантин, антераксантин, зеаксантин).

Важно отметить, что фотосистема II более чувствительна к стрессовым воздействиям, чем фотосистема I. Некоторые авторы утверждают, что в состав фотосистемы II входит пара важнейших пигмент-белковых комплексов, содержащих как каротиноиды ксантофиллового цикла и $Hl \alpha$, $Hl \beta$ (светособирающий комплекс), так и β -каротин с хлорофиллом α (комплекс ядра фотосистемы II) [35,36]. Как показывают табличные данные, в черных листьях бадана происходило накопление содержания β -каротина, лютеина и пигментов виолаксантинового цикла на фоне понижения содержания хлорофиллов. Похожие преобразования были отмечены у большинства голосеменных деревьев и кустарников [31].

Что касается каротиноидов, то их значение, отнесенное к единице хлорофилла, выросло почти в 3 раза в красных листьях к началу зимы. По мнению многих авторов (Головкин Т. К. [31], Овсянников А. Ю. [32], Дымов О. В. [25]), в целом сезонная динамика содержания каротиноидов и зеленых пигментов идентична. Так, количество каротиноидов в начале лета незначительно, их минимум наблюдается в период цветения растений, в конце мая — начале июня, а осенью, при снижении температуры среды, а также при уменьшении интенсивности и изменении спектрального состава света, синтез каротиноидов усиливается.

Долгое время считалось, что функциями каротиноидов являются светособирающая и защитная (тушение возбужденных состояний хлорофилла). В последней четверти прошлого века усилился интерес к изучению каротиноидов и были выявлены новые функции (структурная, взаимодействие с активными формами кислорода, участие в сборке комплексов и т. д.) [4]. В настоящее время выделены четыре основные функции каротиноидов: светособирающая, антиоксидантная, фотопротекторная (участие в фотохимических процессах), структурная. Некоторые авторы [21] считают, что светособирающая (антенная) функция считается энергетической, так как каротиноиды, поглощая свет в сине-зеленой области спектра, где хлорофилл не эффективен, переносят поглощенную энергию света на синглетный возбужденный уровень хлорофилла. По другим данным, умение каротиноидов нейтрализовать реакцию окисления заключается в том, что они способны предотвращать повреждения, вызываемые образованием триплетного хлорофилла и синглетного кислорода [37,38]. Бесспорно, каротиноиды улавливают активизированный кислород, проявляя при этом антиоксидантный эффект.

Авторы полагают, что фотопротекторная роль каротиноидов заключается в том, что они защищают реакционные центры от сильных потоков энергии при высокой освещенности [25], в частности β -каротин защищает фотосинтетический аппарат, подавляя молекулы хлорофилла α , находящиеся в триплетном возбужденном состоянии, и препятствуя этим передаче энергии к кислороду. Как утверждает Дымов О. В. [25], путем ферментативной модификации ксантофиллов образуются каротиноиды, утилизирующие излишнюю энергию световой волны в тепло эффективнее, чем их предшественники.

Незначительное снижение содержания каротиноидов в черных листьях, по-видимому, связано с частичным обновлением ресурса хлорофиллов.

Серьезные изменения претерпели и индивидуальные пигменты ксантофиллового цикла. Наибольшее содержание зеаксантина отмечено в черных (перезимовавших) листьях бадана — его количество возрастало ранней весной, в то время как в красных листьях в преобладающем количестве находился виолаксантин.

Снижение величины светособирающего комплекса II фотосистемы II сопровождалось возрастанием β -каротина в черных листьях, что в свою очередь сказалось на ферментативных взаимопревращениях между виолаксантином и зеаксантином и на количестве образованного промежуточного продукта — антероксантина. Скорее всего, это связано со светозащитной функцией каротиноидов при небольшой температуре. Листья бадана толстолистного перезимовывают под осыпавшейся листвой и снежным покровом. После оттаивания снега весной листья подвергаются не только значительному облучению, но и воздействию невысоких температур. В этой ситуации самосохранению фотосинтетического аппарата в черных листьях благоприятствует повышенная степень изменения пигментов ксантофиллового цикла и накопление пигмента — зеаксантина. Из числа ксантофилловых пигментов в красных листьях преобладают лютеин, на долю которого приходилось до 51% суммы каротиноидов.

Следует заметить, что виолаксантин, антераксантин и зеаксантин являются пигментами ксантофиллового цикла, которые предотвращают повышенное раздражение фотосистемы за счет усиления теплового рассеивания той части энергии, которая не используется для фотосинтетического переноса электронов. Как отмечает автор [25], жизнедеятельность зеаксантина-зависимого защитного механизма обеспечивает тепловое (безызлучательное) рассеивание поглощенной энергии и способствует снижению риска фотодинамического повреждения структурной организации фотосинтетического аппарата в неблагоприятных ситуациях. Работами ряда авторов показано, что такой пигмент ксантофиллового цикла, как зеаксантин может синтезироваться следующими способами — дезоксидацией виолаксантина или гидроксилированием β -каротина [30]. В свою очередь ксантофиллы способны перехватывать свободные радикалы в липидной фазе мембран, повышать упругость мембран, снижать доступ молекулярного кислорода внутрь билипидного слоя и защищать тилакоиды от разрушения вследствие совместного действия света и кислорода [30,36].

Аклиматизация фотосинтетического аппарата листьев бадана к сезонным изменениям среды взаимосвязана с преобразованием пигмент-белковых комплексов. По мнению Д. Барбера, выносливость фотосинтетического аппарата приобретает устойчивость посредством преобразования концентрации и рекомбинации зеленых и желтых пигментов в светособирающем комплексе и реакционных центрах фотосистем [35]. Forster В. подтверждает теорию о том, что в состав пигмент-белковых комплексов хлоропластов входят как зеленые пигменты, так и каротиноиды, реализующие картировочную миссию в комплексах фотосистемы II (β -каротин) и в светособирающих комплексах (лютеин) [39]. Биомолекула ансамбля фотосистемы II охватывает 36 хлорофиллов и 11 каротиноидов в виде транс- β -каротина [40].

Скорее всего, различия в величине этих значений связаны с тем, что листья до и после перезимовки — это листья разного возрастного и функционального состояния. В весенний период черные (перезимовавшие) листья, во-первых, снабжают дикорос продуктами протекающего процесса преобразования энергии видимого света, а во-вторых, являются запасными веществами прежде возобновленного углерода и других веществ, очень нужных для благополучного и результативного размножения. Следует заметить, что расцветание бадана толстолистного протекает ранней весной после схода снега, а черные листья приобретают зеленую окраску в июне месяце.

По мнению Куниной В. А. и др. авторов [41], в осенний период у большинства древесных растений деградирование фотосистемы I наблюдалось перед сбрасыванием листьев, в отличие от фотосистемы II. Подобный процесс деградации фотосистемы I отмечен в период процесса отцветания зерновых растений [13].

Помимо этого, в работе были изучены изменения низкотемпературных спектров флуоресценции хлорофилла, характеризующих состояние пигмент-белковых комплексов фотосистем листьев бадана разных сроков вегетации.

Учитывая, что основная область спектра поглощения солнечной радиации пигментами находится в сине-фиолетовой области, можно предположить, что изменение состава света также может являться регуляторным фактором сезонной динамики их содержания. Данный факт косвенно подтверждается наличием большого числа каротиноидов в течение всего осенне-зимнего периода. Кроме того, в зимних условиях при низких температурах, а также при ограниченном функционировании фотосинтетического аппарата и эффективного ассимиляционного использования захваченной солнечной радиации увеличивается значение процесса деактивации энергии возбуждения молекул хлорофилла и ее тепловой диссипации в клеточных структу-

рах. Это значительно усиливает функциональную нагрузку на каротиноиды и обуславливает необходимость высокого их содержания [31].

Изменения низкотемпературных спектров флуоресценции листьев бадана осуществляли при $E_x = 435$ нм, при этом все без исключения спектры приближены к наибольшему показателю флуоресценции при 695 нм (Рисунок 4).

Как показывают данные, в спектрах низкотемпературной флуоресценции листьев бадана толстолистного в период активизации $E_x = 435$ нм (абсорбция хлорофилла α) установлены следующие наибольшие значения: при длине волны 685 нм, 695 нм и 735 нм. Спектральная линия флуоресценции при длине волны 685 и 695 нм соответственно подтверждает наличие хлорофилл-а-белкового комплекса реакционного центра фотосистемы II и его светособирающего комплекса II. О наличии хлорофилл-а-белкового комплекса реакционного центра фотосистемы I со светособирающим комплексом I свидетельствует спектр излучения при длине волны 735 нм.

Спектры флуоресценции хлоропластов, выделенных из красных листьев бадана, имели три максимума: при длине волны 685 нм (антенна CP43), 695 нм (антенна CP47) и хорошо выраженный пик при длине волны 735 нм (фотосистема I). В черных листьях этого растения характер спектра низкотемпературной флуоресценции хлоропластов оставался прежним, но интенсивность флуоресценции несколько снижалась. Низкотемпературные спектры хлоропластов, выделенных из зеленых листьев, показали три максимума поглощения, что свидетельствует о функционировании обеих фотосистем. Однако на фоне восстановления пиков флуоресценции при длине волны 735 и 695 нм было заметно снижение интенсивности поглощения при длине волны 685 нм.

В холодные сезоны года механизм защиты фотосинтетического аппарата от света высокой интенсивности, используемый растениями, теряет эффективность из-за снижения электронного транспорта и пониженной энергизации мембран. Поэтому особенно важными становятся механизмы, не зависящие от света, которые регулируют биосинтез реакционного центра фотосистемы II и обеспечивают структурно-функциональную перестройку светособирающего комплекса II. Они позволяют повысить устойчивость к нефотохимическому тушению путем агрегации белков светособирающего комплекса II и за счет накопления каротиноидов зеаксантина и лютеина, которые обладают фотозащитными и антиоксидантными свойствами, а также увеличивают значимость белков PsbS и ELIP [42]. Энергетический баланс между фотосистемой II и фотосистемой I в естественных условиях холодной акклиматизации у растений контролируется через окислительный стресс хинона, вовлеченного в цепь переноса электронов световой фазы фотосинтеза, на которое существенное влияние оказывает усиление циклического транспорта электрона в фотосистеме I и хлоропластного дыхания [43].

Для Дальневосточного региона характерно быстрое по темпам снижение температуры, что приводит к установлению большего градиента между падением температуры и фотопериода по сравнению с регионами при той же широте с более мягким климатом. Также этот регион отличают крайне низкие температуры зимой. Эти особенности определяют специфику холодной адаптации первичных процессов фотосинтеза дикорастущих растений.

4. Выводы

В целом проведенные исследования подтверждают, что бадан толстолистный *Bergenia crassifolia* (L.) Fitch имеет высокие показатели пищевой ценности. Отмечено, что в течение вегетационного цикла бадана толстолистного показатели основных фотосинтети-

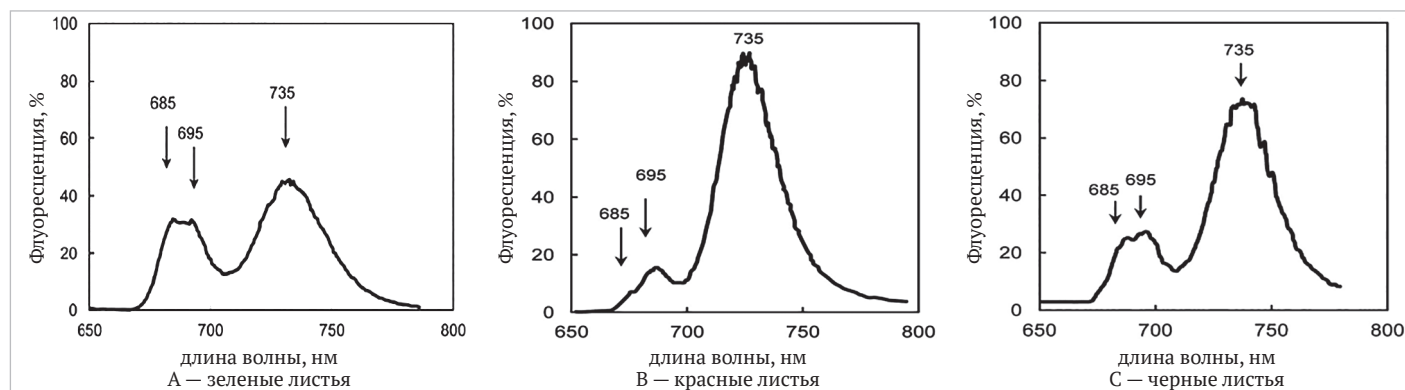


Рисунок 4. Сезонные изменения низкотемпературных спектров флуоресценции листьев бадана

Figure 4. Seasonal changes of the low-temperature fluorescence spectra of leaves of leather bergenia

ческих пигментов перестраиваются в значительных масштабах, отображая самоприспосабливающиеся изменения его светособирающего комплекса ответно на периодические сезонные явления светового и температурного регламентов в местообитании. Существенные микроконцентрации красителей (пигментов) в листьях бадана разных сроков вегетации указывают на эффективную деятельность светособирающей антенны этого дикороса, что, по-видимому, способствует удерживанию фотосинтетической продукции в вегетационные фазы развития на постоянном уровне. Небольшие значения пигментов в черных и красных листьях бадана подтверждают факт фотоповреждения, приведшего к затормаживанию их фотосинтетической активности и роста.

Полученные нами данные интересны не только с точки зрения оценки функционального состояния бадана толстолистного в течение года, но и в связи с массовым использованием натуральных природных пигментов в медицине, пищевой и фармацевтической промышленности. Нельзя не сказать о том, что листья и корневище бадана широко используются при изготовлении разнообразных лекарственных препаратов, пищевых и биологически активных добавок, бальзамов, сиропов, напитков, различных видов травяного чая.

Обладая информацией о содержании фотосинтетических пигментов листьев бадана толстолистного, собранных в разные периоды вегетации, можно выявить наиболее подходящее время для их заготовки с целью широкого использования в качестве натуральных красителей, тем более что достаточная обеспеченность сырьевыми запасами бадана в Бурятии не вызывает сомнения.

Очень важно отметить, что применение природных добавок не имеет химического происхождения и не оказывает отрицательного влияния на организм человека, особенно в случае аллергических заболеваний. А в связи с большим потенциалом натуральных красителей в качестве компонентов функционального питания огромный интерес представляют не только полезные для здоровья естественные пигменты, но и созданные природой растительные продукты, содержащие смеси этих соединений, долгое время применявшиеся в народной медицине без тщательного изучения и научного подтверждения их достоинств. Характеристика путей биосинтеза натуральных пигментов различных видов растений и его генетическая регуляция обеспечивают ценный ресурс, позволяющий создавать новые продукты с повышенными функциональными качествами для улучшения питания человека.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Черевко, А. И., Михайлов, В. М. (2022). Энциклопедия питания. Том 4. Пищевые добавки. (Бакалавриат). Справочное издание. Москва: Издательство «ЛитРес».
- Dysin, A. P., Egorov, A. R., Godzishvskaya, A. A., Kirichuk, A. A., Tskhovrebov, A. G., Kritchenkov, A. S. (2023). Biologically active supplements affecting producer microorganisms in food biotechnology: A review. *Molecules*, 28(3), Article 1413. <https://doi.org/10.3390/molecules28031413>
- Fernandes, A. S., Nascimento, T. C. do, Jacob-Lopes, E., Rosso, V. V. D., Zepka, L. Q. (2018). Carotenoids — A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. Chapter in a book: *Progress in Carotenoid Research*. Brazil: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79542>
- Юркова, А. А. (2021). Исследования влияния пигментов на окрас растений. *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*, 5–2(56), 69–72. <https://doi.org/10.24412/2500-1000-2021-5-2-69-72>
- Лубсандоржиева, П. Б. (2010). Содержание фенольных кислот в многокомпонентных сборах. *Acta Biomedica Scientifica*, 3, 241–244.
- Цирендоржиева, С. В., Хамаганова И. В. (2017). Использование черных листьев бадана в производстве пищевых продуктов. *Техника и технология пищевых производств*, 45(2), 81–86.
- Раджидип, С., Бхавана, П., Храмченко, В. Е. (2019). Содержание аскорбиновой кислоты в зеленых, красных и черных листьях бадана толстолистного. *Научное обозрение. Педагогические науки*, 4(4), 86–89.
- Цирендоржиева, С. В., Жамсаранова, С. Д. (2020). Сравнительная оценка антиоксидантной активности экстрактов листьев *bergenia crassifolia* (L.) Fitch разных сроков вегетации. *Химия растительного сырья*, 2, 231–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.14258/jcprm.2020024349>
- Батомункуев, А. Б., Анцупова, Т. П., Лубсандоржиева, П. Б., Николаева, Г. Г. (2012). Сравнительный анализ биологически активных веществ зеленых и ферментированных (черных) листьев бадана толстолистного. *Acta Biomedica Scientifica*, 4(86), 18–20.
- Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., Chen, F. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1030064>
- Колдаев, В. М., Кропотов, А. В. (2021). Антоцианы в практической медицине. *Тихоокеанский медицинский журнал*, 3, 24–28.
- Zhu, F. (2018). Anthocyanins in cereals: Composition and health effects. *Food Research International*, 109, 232–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.015>
- Юдина, Р. С., Гордеева, Е. И., Шоева, О. Ю., Тихонова, М. А., Хлесткина, Е. К. (2021). Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 25(2), 178–189. <https://doi.org/10.18699/VJ2.022>
- Колдаев, В. М., Кропотов, А. В. (2022). Каротиноиды в практической медицине. *Тихоокеанский медицинский журнал*, 1, 65–71. <https://doi.org/10.34215/1609-1175-2022-1-65-71>
- Kowsalya, K., Vidya, N., Vijayalakshmi, V., Arun, M. (2019). Super nutritive marine astaxanthin, an effectual dietary carotenoid for neurodegenerative diseases. *International Research Journal of Multidisciplinary Technovation*, 1(6), 115–124. <https://doi.org/10.34256/irjmtcon14>
- Дейнека, В. И., Шапошников, А. А., Дейнека, Л. А., Гусева, Т. С., Вострикова, С. М., Шенцева, Е. А. и др. (2008). Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*, 6–2(46), 19–25.
- Rodriguez-Concepción, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D. et al. (2018). A global view of carotenoids: Metabolism, biotechnology, and nutritional and health benefits. *Progress in Lipid Research*, 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
- Ситун, Н. В., Текутьева, Л. А., Фищенко, Е. С., Сон, О. М., Бобченко, В. И. (2016). Вареные колбасные изделия с использованием пищевой добавки «Ликопин». *Пищевая промышленность*, 12(5), 12–16.
- Баулина, Т. В., Зайцева, Л. В., Осипов, М. В., Баженова, А. Е. (2021). Помадные конфеты, обогащенные бета-каротином. *Вестник КрасГАУ*, 9(174), 179–186. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2021-9-179-186>
- Нилова, Л. П., Потороко, И. Ю. (2021). Каротиноиды в растительных пищевых системах. *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии*, 9(4), 54–69.
- Rodrigues, T. L. M., Silva, M. E. P., Gurgel, E. S. C., Oliveira, M. S., Lucas, F. C. A. (2022). *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae): A literature review of traditional uses, chemical composition, and pharmacological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, Article 2896895. <https://doi.org/10.1155/2022/2896895>
- Прядкина, Г. А. (2018). Пигменты, эффективность фотосинтеза и продуктивность пшеницы. *Plant Varieties Studying and Protection*, 14(1), 97–108. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.1.2018.126524>
- Romodina, L. A., Lysenko, N. P. (2022). The radioprotective effect of chlorophyll-based drugs. *Biophysics*, 67(1), 78–84. <https://doi.org/10.1134/s0006350922010158>
- Sautkina, M. Yu. (2021). Dynamics of the content of chlorophylls in the leaves of the english oak (*quercus robur* L.) of the forest-steppe zone. *Journal of Agriculture and Environment*, 1(17), 1–4. <https://doi.org/10.23649/jae.2021.1.17.11>
- Дымова, О. В., Головкин, Т. К. (2018). Фотосинтетические пигменты: функционирование, экология, биологическая активность. *Известия Уфимского научного центра РАН*, 3–4, 5–16.
- Курдюков, Е. Е., Семенова, Е. Ф., Моисеева, И. Я., Гаврилова, Н. А., Пономарева, Т. А. (2020). Количественное определение суммы каротиноидов в плодах дерезы китайской *Lythium chinense* Mill. *Химия растительного сырья*, 3, 139–144. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020036609>
- Сычев, С. Н., Гаврилина, В. А. (2022). Высокоэффективная жидкостная хроматография: аналитика, физическая химия, распознавание многокомпонентных систем. Санкт-Петербург: Лань, 2022.
- Галушина, П. С. (2023). Применение естественных пищевых красителей из растительного сырья в пищевой промышленности. *Тенденции развития науки и образования*, 95(8), 128–130. <https://doi.org/10.18411/trnio-01-2023-416>
- Bonanno, G., Cirelli, G. L. (2017). Comparative analysis of element concentrations and translocation in three wetland congener plants: *Typha domingensis*, *Typha latifolia* and *Typha angustifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.021>
- Шелякин, М. А., Захожий, И. Г., Далькэ, И. В., Дымова О. В., Малышев Р. В., Головкин Т. К. (2021). Фотосинтетическая и декоративная способность талломов крупнолиственного лишайника *Lobaria pulmonaria* в годичном цикле. *Физиология растений*, 68(6), 600–611. <https://doi.org/10.31857/S001533032106018X>
- Головкин, Т. К., Яцко, Я. Н., Дымова, О. В. (2013). Сезонные изменения состояния фотосинтетического аппарата трех бореальных видов хвойных растений в подзоне средней тайги на европейском Северо-Востоке. *Хвойные бореальной зоны*, 31(1–2), 73–78.
- Овсянников, А. Ю., Семкина, Л. А. (2014). Сезонные изменения активности фотосистемы II и локализации хлоропластов в клетках хвои растений рода *Picea* (PINACEAE). *Ботанический журнал*, 99(9), 977–988.
- Markovskaya, E., Kosobryukhov, A., Gulyaeva, E., Starodubtseva, A. (2020). Adaptation of halophytes to the gradient conditions on the northern seas coast. Chapter in a book: *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II*. Springer, Singapore, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_32
- Тютерева, Е. В., Дмитриева, В. А., Войцеховская, О. В. (2017). Хлорофилл β как источник сигналов, регулирующих развитие и продуктивность растений. *Сельскохозяйственная биология*, 52(5), 843–855. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.843>
- Barber, J. (2014). Photosystem II: Its function, structure, and implications for artificial photosynthesis. *Biochemistry (Moscow)*, 79(3), 185–196. <https://doi.org/10.1134/S0006297914030031>
- Nelson, D. L. (2022). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 2022.
- Leitao, D. d. S. T. C., Siqueira, F. C., de Sousa, S. H. B., Mercadante, A. Z., Chiste, R. C., Lopes, A. S. (2020). Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1452–1464. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1811311>

38. Ладыгин, В. Г. (2014). Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2(6), статья 1.
39. Förster, B., Pogson, B. J., Osmond, C. B. (2011). Lutein from deepoxidation of lutein epoxide replaces zeaxanthin to sustain an enhanced capacity for nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in avocado shade leaves in the dark. *Plant Physiology*, 15(1), 393–403. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173369>
40. Моисеева, Е. А., Кравченко, И. В., Шепелева, Л. Ф., Бордей, Р. Х. (2022). Накопление фотосинтетических пигментов и вторичных метаболитов в листьях галеги (*Galega orientalis* lam.) сорта гале в зависимости от возраста травостоя и агротехнологии при интродукции в зоне средней тайги западной Сибири. *Сельскохозяйственная биология*, 57(1), 44–65. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.1.44rus>
41. Кунина, В. А., Белоус, О. Г. (2020). Состояние фотосинтетических пигментов листьев древесных растений в условиях городской среды. *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского Биология. Химия*, 6 (72) (2), 108–118. <https://doi.org/10.37279/2413-1725-2020-6-2-108-118>
42. Софронова, В. Е., Антал, Т. К., Дымова, О. В., Головки, Т. К. (2018). Сезонные изменения первичных процессов фотосинтеза при низкотемпературной адаптации хвои *Pinus sylvestris* в Центральной Якутии. *Физиология растений*, 65(5), 331–339. <https://doi.org/10.1134/S0015330318050160>
43. Ruban, A. V., Johnson, M. P., Duffy, C. D. P. (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics*, 1817, 167–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.007>

REFERENCES

1. Cherevko, A. I., Novikova, E. V. (2022). Encyclopedia of Nutrition. Volume 4. Food additives. (Bachelor's degree). Reference edition. Moscow: Publishing House LitRes (In Russian)
2. Dysin, A. P., Egorov, A. R., Godzishvskaya, A. A., Kirichuk, A. A., Tskhovrebov, A. G., Kritchenkov A. S. (2023). Biologically active supplements affecting producer microorganisms in food biotechnology: A review. *Molecules*, 28(3), Article 1413. <https://doi.org/10.3390/molecules28031413>
3. Fernandes, A. S., Nascimento, T. C. do, Jacob-Lopes, E., Rosso, V. V. D., Zepka, L. Q. (2018). Carotenoids — A Brief Overview on Its Structure, Biosynthesis, Synthesis, and Applications. Chapter in a book: Progress in Carotenoid Research. Brazil: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79542>
4. Yurkova, A. A. (2021). Studies of the effect of pigments on the color of plants. *International Journal of Humanities and Natural Sciences*, 5–2(56), 69–72. <https://doi.org/10.24412/2500-1000-2021-5-2-69-72> (In Russian)
5. Lubsandorzheeva, P. B. (2010). The content of phenolic acids in multy-component herb teas. *Acta Biomedica Scientifica*, 3, 241–244. (In Russian)
6. Tsyrendorzheeva, S. V., Khamaganova, I. V. (2017). The use of black leaves of bergenia in food production. *Food Processing: Techniques and Technology*, 45(2), 81–86. (In Russian)
7. Rajdeep, S., Bhawana, P., Khranchenko, V. E. (2019). Ascorbic acid concentration in green, red, and black leaves of bergenia crassifolia. *Scientific Review. Pedagogical Sciences*, 4–4, 86–89. (In Russian)
8. Tsyrendorzheeva, S. V., Zhamsaranova, S. D. (2020). Comparative evaluation of antioxidant activity of extracts of bergenia crassifolia (L.) Fitch leaves of different terms of vegetation. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2, 231–239. <https://doi.org/10.14258/jcpm.2020024349> (In Russian)
9. Batomunkuev, A. B., Antsupova, T. P., Lubsandorzheeva, P. B., Nikolaeva, G. G. (2012). Comparative analysis of biologically active substances of green and fermented (black) leaves of leather bergenia. *Acta Biomedica Scientifica*, 4(86), 18–20. (In Russian)
10. Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., Chen, F. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1030064>
11. Koldaev, V. M., Kropotov, A. V. (2021). Anthocyanins in practical medicine. *Pacific Medical Journal*, 3, 24–28. (In Russian)
12. Zhu, F. (2018). Anthocyanins in cereals: composition and health effects. *Food Research International*, 109, 232–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.015>
13. Yudina, R. S., Gordeeva, E. I., Shoeva, O. Yu., Tikhonova, M. A., Khlestkina, E. K. (2021). Anthocyanins as functional food components. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 25 (2), 178–189. <https://doi.org/10.18699/VJ2.022> (In Russian)
14. Koldaev, V. M., Kropotov, A. V. (2022). Carotenoids in practical medicine. *Pacific Medical Journal*, 1, 65–71. <https://doi.org/10.34215/1609-1175-2022-1-65-71> (In Russian)
15. Kowsalya, K., Vidya, N., Vijayalakshmi, V., Arun, M. (2019). Super nutritive marine astaxanthin, an effectual dietary carotenoid for neurodegenerative diseases. *International Research Journal of Multidisciplinary Technovation*, 1(6), 115–124. <https://doi.org/10.34256/irjmtcon14>
16. Deyneka, V. I., Shaposhnikov, A. A., Deyneka, L. A., Guseva, T. S., Vostrikova, S. M., Shentseva, E. A. et al. (2008) Carotenoids: the structure, biological functions and perspectives of application. *Scientific Bulletins of the Belgorod State University, Medicine. Pharmacy*, 6–2(46), 19–25. (In Russian)
17. Rodriguez-Concepción, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D. et al. (2018). A global view of carotenoids: Metabolism, biotechnologies, and nutritional and health benefits. *Progress in Lipid Research*, 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
18. Situn, N. V., Tekutyeva, L. A., Fishchenko, E. S., Son, O. M., Bobchenko, V. I. (2016). Cooked sausages with use of food additive «Lycopene». *Food Industry*, 12(5), 12–16. (In Russian)
19. Baulina, T. V., Zaitseva, L. V., Osipov, M. V., Bazhenova, A. E. (2021). Fondant sweets enriched with beta-carotene. *The Bulletin of KrasGAU*, 9(174), 179–186. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2021-9-179-186> (In Russian)
20. Nilova, L. P., Potoroko, I. Yu. (2021). Carotenoids in plant food systems. *Bulletin of the South Ural State University. Series: Food and Biotechnology*, 9(4), 54–69. (In Russian)
21. Rodrigues, T. L. M., Silva, M. E. P., Gurgel, E. S. C., Oliveira, M. S., Lucas, F. C. A. (2022). *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae): A literature review of traditional uses, chemical composition, and pharmacological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, Article 2896895. <https://doi.org/10.1155/2022/2896895>
22. Pryadkina, G. A. (2018). Pigments, efficiency of photosynthesis and winter wheat productivity. *Plant Varieties Studying and Protection*, 14(1), 97–108. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.1.2018.126524> (In Russian)
23. Romodin, L. A., Lysenko, N. P. (2022). The radioprotective effect of chlorophyll-based drugs. *Biophysics*, 67(1), 78–84. <https://doi.org/10.1134/s0006350922010158>
24. Sautkina, M. Yu. (2021). Dynamics of the content of chlorophylls in the leaves of the english oak (*quercus robur* L.) of the forest-steppe zone. *Journal of Agriculture and Environment*, 1(17), 1–4. <https://doi.org/10.23649/jae.2021.1.17.11>
25. Dymova, O. V., Golovko, T. K. (2018). Photosynthetic pigments: Functioning, ecology and biological activity. *Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*, 3(4), 5–16. (In Russian)
26. Kurdyukov, Ye. Ye., Semenova, Ye. F., Moiseeva, I. Ya., Gavrilova, N. A., Ponomareva, T. A. (2020). Quantitative determination of the amount of carotenoids in the fruits of *Lycium chinense* Mill. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 3, 139–144. <https://doi.org/10.14258/jcpm.2020036609> (In Russian)
27. Sychev, S. N., Gavrilina, V. A. (2022). High-performance liquid chromatography: analytics, physical chemistry, identification of multicomponent systems. St. Petersburg: Lan, 2022. (In Russian)
28. Galushina, P. S. (2023). Use of natural food colorants from plant raw materials in the food industry. *Trends in the Development of Science and Education*, 93(8), 128–130. <https://doi.org/10.18411/trnio-01-2023-416> (In Russian)
29. Bonanno, G., Cirelli, G. L. (2017). Comparative analysis of element concentrations and translocation in three wetland congener plants: *Typha domingensis*, *Typha latifolia* and *Typha angustifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.021>
30. Shelyakin, M. A., Zakhoshyi, I. G., Dalke, I. V., Dymova, O. V., Malyshev, R. V., Golovko, T. K. (2021). Photosynthetic and respiratory capacity of foliose lichen *lobaria pulmonaria* throughout the annual cycle. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68(6), 600–611. <https://doi.org/10.31857/S001533032106018X> (In Russian)
31. Golovko, T. K., Yatsko, Ya. N., Dymova, O. V. (2013). Photosynthetic apparatus state seasonal changes of three boreal coniferous in taiga middle subzone of Europe North-East. *Conifers of the Boreal Zone*, 31(1–2), 73–78. (In Russian)
32. Ovsyannikov, A. Yu., Syomkina, L. A. (2014). Seasonal changes in the photosystem ii activity and chloroplast localization in cells of picea (PINACEAE) needles. *Botanicheskii Zhurnal*, 99(9), 977–988. (In Russian)
33. Markovskaya, E., Kosobryukhov, A., Gulyaeva, E., Starodubtseva, A. (2020). Adaptation of halophytes to the gradient conditions on the northern seas coast. Chapter in a book: Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II. Springer, Singapore, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2172-0_32
34. Tyutereva, E. V., Dmitrieva, V. A., Voitsekhovskaya, O. V. (2017). Chlorophyll β as a source of signals steering plant development (review). *Agricultural Biology*, 52(5), 843–855. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.843> (In Russian)
35. Barber, J. (2014). Photosystem II: Its function, structure, and implications for artificial photosynthesis. *Biochemistry (Moscow)*, 79(3), 185–196. <https://doi.org/10.1134/S0006297914030031>
36. Nelson, D. L. (2022). Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York, 2022.
37. Leitao, D. d. S. T. C., Siqueira, F. C., de Sousa, S. H. B., Mercadante, A. Z., Chiste, R. C., Lopes, A. S. (2020). Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1452–1464. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1811311>
38. Ladygin, V. G. (2014). Ways of biosynthesis, localization, metabolism and functions of carotenoids in chloroplasts of different types of algae. *Issues of Modern Algaeology*, 2(6), Article 1. (In Russian)
39. Förster, B., Pogson, B. J., Osmond, C. B. (2011). Lutein from deepoxidation of lutein epoxide replaces zeaxanthin to sustain an enhanced capacity for nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in avocado shade leaves in the dark. *Plant Physiology*, 15(1), 393–403. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173369>
40. Moiseeva, E. A., Kravchenko, I. V., Shepeleva, L. F., Bordey, R. Kh. (2022). Accumulation of photosynthetic pigments and secondary metabolites in leaves of galega (*Galega orientalis* lam.) cv. Gale depending on stand age and agrotechnologies during introduction in the middle taiga of Western Siberia. *Agricultural Biology*, 57(1), 44–65. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.1.44rus> (In Russian)
41. Kunina, V. A., Belous, O. G. (2020). State of photosynthetic pigments leaves of woody plants in an urban environment. *Scientific Notes V. I. Vernadsky Crimean Federal University Biology. Chemistry*, 6 (72) (2), 108–118. <https://doi.org/10.37279/2413-1725-2020-6-2-108-118> (In Russian)
42. Sofronova, V. E., Antal, T. K., Dymova, O. V., Golovko, T. K. (2018). Seasonal changes in primary photosynthetic events during low temperature adaptation of *Pinus sylvestris* in Central Yakutia. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(5), 331–339. <https://doi.org/10.1134/S0015330318050160> (In Russian)
43. Ruban, A. V., Johnson, M. P., Duffy, C. D. P. (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics*, 1817, 167–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.007>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Цырендоржиева Светлана Владимировна — кандидат технических наук, доцент, кафедра «Технология и организация питания. Сервис и туризм», Институт пищевой инженерии и биотехнологии, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления 670013, Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40В, строение 1 Тел.: +7-902-168-35-50 E-mail: ts-svetlana1971@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9941-5174 * автор для контактов	Svetlana V. Tsyrendorzhieva, Candidate of Technical Sciences, Docent, Department of Technology and Catering. Service and Tourism, Institute of Food Engineering and Biotechnology, East Siberian State University of Technology and Management 40/1, Klyuchevskaya str., 670013, Ulan-Ude, Russia Tel.: +7-902-168-35-50 E-mail: ts-svetlana1971@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0001-9941-5174 * corresponding author
Жамсаранова Сэсэгма Дашиевна — доктор биологических наук, профессор, кафедра «Биотехнология», Институт пищевой инженерии и биотехнологии, Руководитель Биотехнологического центра, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления Профессор, кафедра фармакологии и традиционной медицины, Медицинский институт, Бурятский государственный университет 670013, Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40В, строение 1 Тел.: +7-924-652-28-58 E-mail: zhamsarans@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-0574-1575	Sesegma D. Zhamsaranova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Biotechnology, Institute of Food Engineering and Biotechnology, Head of the Biotechnology Center, East Siberian State University of Technology and Management Professor, Department of Pharmacology and Traditional Medicine, Medical Institute, Buryat State University 40B/1, Klyuchevskaya str., 670013, Ulan-Ude, Russia Tel.: +7-924-652-28-58 E-mail: zhamsarans@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-0574-1575
Баженова Баяна Анатольевна — доктор технических наук, профессор, кафедра «Продукты питания животного происхождения. Товароведение», Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления 670013, Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40В, строение 1 Тел.: +7-902-454-21-46 E-mail: bayanab@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7380-5959	Bayana A. Bazhenova, Doctor of Technical Sciences, Professor, Department of “Technology of Animal Products. Commodity Science”, East Siberian State University of Technology and Management 40B/1, Klyuchevskaya str., 670013, Ulan-Ude, Russia Tel.: +7-902-454-21-46 E-mail: bayanab@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7380-5959
Хамаганова Инга Вячеславовна — доктор технических наук, доцент, кафедра «Технология и организация питания. Сервис и туризм», Институт пищевой инженерии и биотехнологии, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления 670013, Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40В, строение 1 Тел.: +7-983-420-26-71 E-mail: xiv2609@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-9953-7654	Inga V. Khamaganova, Doctor of Technical Sciences, Docent, Department of Technology and Catering. Service and Tourism, Institute of Food Engineering and Biotechnology, East Siberian State University of Technology and Management 40B/1, Klyuchevskaya str., 670013, Ulan-Ude, Russia Tel.: +7-983-420-26-71 E-mail: xiv2609@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-9953-7654
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-497-503>

Поступила 07.07.2023

Поступила после рецензирования 30.11.2023

Принята в печать 06.12.2023

© Сутула Г. И., Рябухин Д. С., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

МИКРОВОДОРОСЛИ И НАСЕКОМЫЕ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ БЕЛКА: ПРЕИМУЩЕСТВА И РИСКИ

Сутула Г. И*, Рябухин Д. С.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, Санкт-Петербург, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

съедобные насекомые,
микроводоросли,
энтомофагия,
альтернативные
белки, технологии

Продукты животного происхождения традиционно считаются основными источниками белка, однако ввиду увеличения населения планеты и загрязнения окружающей среды возникает необходимость поиска новых решений для удовлетворения базовой потребности человека в питании. Альтернативой могут стать насекомые и микроводоросли — группы организмов, которые по своим питательным свойствам и химическому составу не уступают продуктам животного происхождения. Они способны оказывать благоприятное воздействие на организм человека за счет высокого содержания витаминов, полиненасыщенных жирных кислот и антиоксидантов. Введение съедобных насекомых или микроводорослей в рацион питания человека имеет множество преимуществ и для окружающей среды, включая сокращение общего объема парниковых газов, снижение потребления земельных ресурсов и воды. В настоящем обзоре рассмотрен химический состав микроводорослей и некоторых видов насекомых, отмечено влияние компонентов сырья на здоровье человека, описаны сопутствующие биологически активные соединения, а также основные технологии культивирования и примеры коммерческого использования. В России ввиду климатических особенностей возможно только сезонное выращивание микроводорослей в открытых бассейнах. Фитобиореакторы для круглогодичной работы требуют значительных финансовых вложений, особенно на дополнительное освещение и обогрев. Микроводоросли в России не пользуются большой популярностью, преимущественно применяются в составе биологически активных добавок. Съедобные насекомые могут быть выращены с использованием вторичных ресурсов и требуют меньших первоначальных вложений. На сегодняшний день они рассматриваются учеными в качестве источника белка для сельскохозяйственных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FGUS2022–0017 и № FGUS2022–0018 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 07.07.2023

Accepted in revised 30.11.2023

Accepted for publication 06.12.2023

© Sutula G. I., Ryabukhin D. S., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

MICROALGAE AND INSECTS AS ALTERNATIVE PROTEIN SOURCES: BENEFITS AND RISKS

Gleb I. Sutula*, Dmitry S. Ryabukhin

All-Russia Research Institute for Food Additives, Saint Petersburg, Russia

KEY WORDS:

edible insects,
microalgae,
entomophagy,
alternative protein,
technology

ABSTRACT

Animal products have traditionally been considered the main sources of protein, but due to the increasing population of the planet and environmental pollution, there is a need to find new solutions to meet basic human nutritional needs. An alternative can be insects and microalgae — groups of organisms that, in their nutritional properties and chemical composition, are not inferior to products of animal origin. They are able to have a beneficial effect on the human body due to their high content of vitamins, polyunsaturated fatty acids and antioxidants. Introducing edible insects or microalgae into the human diet has many environmental benefits, including reducing overall greenhouse gases and reducing land and water consumption. This review examines the chemical composition of microalgae and some types of insects, notes the influence of raw material components on human health, describes associated biologically active compounds, as well as basic cultivation technologies and examples of commercial use. In Russia, due to climatic conditions, only seasonal cultivation of microalgae in open pools is possible. Phytobioreactors for year-round operation require significant financial investments, especially for additional lighting and heating. Microalgae are not very popular in Russia; they are mainly used as part of dietary supplements. Edible insects can be grown using recycled resources and require less initial investment. Today they are considered by scientists as a source of protein for farm animals.

FUNDING: This article was published as part of the research topic No. FGUS2022–0017 and No. FGUS2022–0018 of the state assignment of the V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS.

1. Введение

Согласно данным ООН, ожидается, что население планеты к 2050 году составит 9,5 млрд человек [1]. Количество потребляемой пищи увеличится, а также изменится относительное содержание питательных веществ в рационе питания человека. Мировой спрос на белок животного происхождения удвоится к 2050 году [2], что вызовет озабоченность ученых по поводу глобальной продовольственной безопасности. Традиционные методы получения животного белка имеют ряд ограничений, связанных с негативным влиянием на

окружающую среду. Главным из них является образование парникового эффекта, поскольку сектор животноводства ответственен за выброс более 14% всех парниковых газов [3] и 59% выбросов аммиака в сельском хозяйстве [4]. Другими отрицательными особенностями отрасли являются большие затраты водных и земельных ресурсов. Меры, принимаемые для смягчения негативных экологических последствий [5], не позволят оставаться в рамках целевого показателя повышения температуры (2 °C), установленного Рамочной конвенцией ООН по климату [6], поэтому изменения в рационе питания

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Сутула, Г. И., Рябухин, Д. С. (2023). Микроводоросли и насекомые как альтернативные источники белка: преимущества и риски. *Пищевые системы*, 6(4), 497–503. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-497-503>

FOR CITATION: Sutula, G. I., Ryabukhin, D. S. (2023). Microalgae and insects as alternative protein sources: Benefits and risks. *Food Systems*, 6(4), 497–503. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-497-503>

будут необходимы. Решением этой проблемы является использование других источников белка, которые можно получать из микроводорослей, насекомых, грибов и бактерий. Наиболее перспективными для этих целей являются насекомые и микроводоросли, так как на данный момент проведено достаточное количество исследований, показавших, что эти группы организмов обладают определенными экономическими и нутрициональными преимуществами.

Целью данного обзора является описание возможностей использования двух групп организмов, микроводорослей и насекомых, в пищевых целях с учетом их химических и нутрициональных особенностей.

2. Материалы и методы

Объектами исследования являлись научные публикации, посвященные изучению возможностей применения насекомых и микроводорослей в пищевых целях. Поиск литературы осуществлялся с помощью базы данных PubMed по ключевым словам «энтомофагия», «съемобные насекомые», «микроводоросли», «биопродукты из микроводорослей». Предпочтение отдавалось работам, опубликованным не более пяти лет назад в зарубежных журналах. Также были рассмотрены и применены данные международных организаций, касающиеся тематики данного обзора.

3. Микроводоросли

Микроводорослями являются одноклеточные организмы, живущие по отдельности, цепочками или группами. Они составляют основу пищевых цепочек, хорошо себя чувствуют в морской и пресной воде, во влажных почвах и горных породах [7]. Большой экономический потенциал микроводорослей обусловлен возможностью их выращивания в районах, непригодных для возделывания растений. Они расходуют энергию солнечного света в несколько раз эффективнее по сравнению с последними, обладая высоким потенциалом к производству биомассы и ценных химических соединений. Однако микроводоросли изучены не так подробно, как сельскохозяйственные культуры.

Использование микроводорослей для повышения питательной ценности продуктов и кормов является перспективным направлением. На сегодняшний день эта филогенетически разнообразная группа организмов нашла ряд промышленных применений, среди которых изготовление продуктов [8], корма [9], компонентов косметики [10], биотоплива [11] и удобрения [12]. Значительного коммерческого успеха в промышленном использовании микроводорослей удалось достигнуть немногим компаниям. Это объясняется следующими факторами: 1 — небольшим размером рынка на данный момент; 2 — необходимостью производства по конкурентоспособной цене по сравнению с альтернативными продуктами, получаемыми путем прямого химического синтеза или непосредственного метаболизма других микроорганизмов: грибов и бактерий; 3 — более жесткими нормативными ограничениями с точки зрения обеспечения безопасности, минимизации воздействия на окружающую среду и спецификации качества [13]. Далеко не все таксоны микроводорослей подходят для промышленного использования. На данный момент наиболее подходящими для питания человека являются *Chlorella* sp. и *Spirulina* sp. Известно, что население Мексики и Африки употребляло *Spirulina* в пищу с древнейших времен, а виды рода *Chlorella* являлись традиционной пищей восточных народов. Промышленное культивирование микроводорослей началось в 1960-х годах в Японии с *Chlorella* sp., применяемой в качестве пищевой добавки. С 1970-х и 80-х годов промышленное производство начало осуществляться в США, Китае, Германии, Франции, Израиле, Австралии, Индии. На Рисунке 1 представлено распределение объемов производства микроводорослей в мире по состоянию на 2019 год. Следует обратить внимание, что из-за коммерческого подхода к сбору информации, данные FAO могут не отражать истинные значения объемов производства в таких странах, как США, Япония, Австралия и некоторых других.

На сегодняшний день совокупное производство составляет 35 000 тонн сухой биомассы в год [14]. В Таблице 1 представлены основные микроводоросли, которые используются в промышленности, их применение и страны-производители [15].

Для удобства биомассу микроводорослей перерабатывают в порошок, таблетки, капсулы, добавляя в различные пищевые продукты. До недавних времен существовала проблема переваривания и утилизации биомассы, так как клетки микроводорослей имеют целлюлозную клеточную стенку, однако на данный момент пути ее решения найдены [16]. Перед коммерческим использованием материал из микроводорослей должен быть проанализирован на нали-

чие различных токсичных соединений [17]. Правила безопасности пищевых продуктов для потребления человека являются основным лимитирующим фактором для биотехнологического применения микроводорослей.

Таблица 1. Виды микроводорослей, используемые в промышленности

Table 1. Microalgae used in the industry

Род/вид микроводоросли	Страны	Вид продукции	Применение
<i>Chlorella</i> sp.	Германия, Япония, Тайвань	Порошки, таблетки, макаронные изделия	Продукты питания, пищевые добавки
<i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira</i>)	США, Япония, Индия, Китай	Порошки, таблетки, чипсы, макаронные изделия, фикобили-протеины	Продукты питания, пищевые добавки, косметика
<i>Dunaliella salina</i>	США, Китай, Австралия, Израиль	Порошки, β-каротин	Пищевые добавки, косметика
<i>Haematococcus pluvialis</i>	США, Индия, Израиль	Порошки, астаксантин	Пищевые добавки



3.1. Химический состав

Микроводоросли можно рассматривать как перспективный альтернативный источник питания благодаря их питательным свойствам и химическому составу. Их функциональная ценность обусловлена высоким содержанием белков, полиненасыщенных жирных кислот, полисахаридов, витаминов, пигментов [18]. Способность синтезировать все аминокислоты, в том числе незаменимые, позволяет рассматривать микроводоросли как нетрадиционный источник белков. Например, сушеная масса *Spirulina* sp. содержит все незаменимые аминокислоты и 68% белков, присутствующих в биомассе, что превышает аналогичные показатели говядины в три раза. Другая микроводоросль, *Chlorella* sp., включает около 60–70% белков, качество которых сопоставимо с белками дрожжей, соевой муки и сухого молока. В целом, содержание белка у разных видов может варьироваться от 30% до 70%. Таким образом, *Spirulina* и *Chlorella* являются основными видами микроводорослей, которые используются в промышленности с целью получения сухой биомассы ввиду высокого содержания белка. Количество липидов в них может превышать 80% по уровню сухой массы, наиболее распространенными значениями являются от 20% до 50% [19], что позволяет применять некоторые микроводоросли для производства биодизельного топлива.

Микроводоросли являются важным источником длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, которые используются в пищевой промышленности в качестве добавок. Они способны синтезировать представителей семейства омега-6 (ω6), которые включают линолевую кислоту, γ-линолевую кислоту (GLA) и арахидоновую кислоту (ARA), а также семейства омега-3 (ω3), включающего в себя линоленовую кислоту, эйкозапентаеновую кислоту (EPA), докозагексаеновую кислоту (DHA). DHA и EPA снижают риск осложнений при сердечно-сосудистых заболеваниях, артрите и гипертонии. Помимо этого, они проявляют гиполипидемическую активность, снижая уровень триглицеридов и повышая уровень липопротеинов высокой плотности [20]. DHA также имеет значение для развития и функ-

ционирования нервной системы. Несмотря на то, что наиболее привычным и распространенным источником EPA и GLA является жирная рыба, данный способ получения ω 3-кислот имеет несколько существенных недостатков: уровни ртуты и дифенила часто бывают небезопасными для определенных категорий потребителей (для детей и беременных женщин, так как развивающаяся нервная система очень восприимчива даже к низким уровням этих веществ); наличие неприятного запаха; снижение объемов рыболовства (многие виды выловлены почти до исчезновения). С другой стороны, рыбы получают омега-3 из рациона, богатого микроводорослями, которые и являются первоначальными продуцентами длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот в водной пищевой цепи. Благодаря более высокой продуктивности по сравнению с другими источниками длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, микроводоросли имеют очень большой потенциал для производства продуктов питания. По всей видимости, особенно подходит для этого индустрия детских смесей, поскольку DHA является необходимым питательным веществом для развивающегося мозга плода, а также имеет определяющее значение в регуляции сетчатки глаза у младенцев [21]. На данный момент на рынке существует несколько компаний, занимающихся промышленным производством DHA. Так, компания Martek (США) разработала и запатентовала два штамма микроводорослей, которые продуцируют масла, богатые DHA. Помимо этого, производством DHA в коммерческих целях занимается компания Lonza (Швейцария). Таким образом, DHA и GLA, полученные из микроводорослей, лучше всего подходят для беременных женщин, детей, вегетарианцев и для пациентов с аллергией на рыбу.

Пигменты микроводорослей относятся, как правило, к трем классам: хлорофиллы; каротины; фикобилипротеины. Они обладают рядом полезных свойств, а именно противовоспалительным, гипотензивным, противоопухолевым, антиоксидантным, антидепрессивным [22], однако их основным применением на данный момент является использование в качестве пищевых красителей. Наибольший интерес для биотехнологии представляют пигменты класса каротинов и фикобилипротеинов. Так, микроводоросль *Spirulina* содержит в 10 раз больше β -каротина по сравнению с любым продуктом питания, включая морковь [23]. β -каротин представляет собой ярко окрашенный оранжевый пигмент, который является предшественником витамина А — широко признанного фактора, влияющего на здоровье детей. Его дефицит приводит к нарушениям зрения и к патологиям легких, трахеи, полости рта. Помимо этого, β -каротин обладает противовоспалительной, противовоспалительной и антиоксидантной активностью [24]. Астаксантин — еще один пигмент, относящийся к классу каротинов, использование которого в пищевых целях было одобрено Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) в 1999 году. Он также обладает рядом полезных свойств, среди которых антидиабетическое, антиоксидантное, противовоспалительное. Фикоцианин — пигмент, относящийся к классу фикобилипротеинов и имеющий уникальный синий цвет, который также используется в пищевой промышленности. Помимо этого, клетки микроводорослей содержат витамины С и Е, никотиновую кислоту, биотин и токоферол. Все перечисленные выше соединения пользуются высоким и постоянно растущим спросом на рынке. *Dunaliella salina* и *Haematococcus pluvialis* являются наиболее часто применяемыми видами микроводорослей для промышленного получения каротинов, так как для них характерен высокий уровень накопления этих соединений.

Микроводоросли также содержат большое количество клетчатки [25] и полисахаридов, из которых агар, каррагинаны, альгинаты являются наиболее экономически важными, так как используются в пищевой промышленности в качестве гелирующих веществ или загустителей в мороженом и мармеладе. Некоторые полисахариды микроводорослей имеют фармакологическое значение, стимулируя иммунную систему человека или обладая потенциально противовирусной активностью [26].

3.2. Применение и технологии производства

Несмотря на положительные стороны использования микроводорослей, на данный момент количество продуктов на их основе достаточно ограничено. В целом, существует две основные категории продуктов пищевого рынка, полученных из микроводорослей [16]. Первая категория — сушеные микроводоросли, в частности, виды родов *Chlorella* и *Spirulina*, характеризующиеся высокой питательной ценностью, а также содержанием витаминов B12, C, D2. Такие продукты могут продаваться в качестве пищевых добавок в виде порошка или таблеток, и на сегодняшний день именно они являются наиболее распространенными и имеют наибольшие объемы

производства. Помимо этого, их используют как добавки к пищевым продуктам, например, к чипсам и макаронным изделиям. Вторая категория — ценные соединения, экстрагированные из клеток микроводорослей: пигменты (фикоцианин, астаксантин), антиоксиданты (β -каротин) и жирные кислоты (DHA/EPA). Данная категория продуктов имеет гораздо меньший объем производства, зато обладает большим рыночным потенциалом. К примеру, объемы производства полиненасыщенных жирных кислот достигают всего 240 т в год [27].

Технологию промышленного пищевого производства микроводорослей в целом можно разделить на несколько этапов: культивирование в питательной минеральной среде, получение биомассы путем осаждения, затем ее сушка и измельчение. В процессе культивирования необходимо обеспечить культуру нужным количеством света, диоксида углерода, воды и минерального состава. В питательной среде должен содержаться необходимый для формирования клеток набор микро- и макроэлементов, в числе которых азот, фосфор, железо, магний. Культивирование происходит при постоянной температуре (20–30 °С, зависит от штамма) и сопровождается непрерывным перемешиванием и аэрацией для предотвращения осаждения клеток и накопления растворенного кислорода. Для промышленного выращивания микроводорослей используют открытые и закрытые системы [15].

Открытые системы представляют собой обычные пруды с доступом воздуха. К негативным особенностям их применения можно отнести зависимость от погодных условий, высокий риск их загрязнения, затраты на воду; к положительным — низкие расходы на строительство и легкость в обслуживании. Глубина открытых систем обычно не превышает 30 см. Циркуляция воды с питательными веществами осуществляется по кругу с помощью механического рычага. Данный тип систем сильно восприимчив к появлению хищных микроводорослей, паразитов или других штаммов, которые растут и развиваются быстрее, чем желаемые виды микроводорослей. В связи с этим только несколько родов подходят для данного типа производства, например, *Spirulina* sp. и *Dunaliella* sp. Совокупность сложностей при открытом типе производства приводит к низким объемам получаемого продукта.

Закрытые системы — фотобиореакторы — обеспечивают стерильность культуры, более эффективны, позволяют намного лучше контролировать условия культивирования (pH, CO₂, O₂), предотвращают испарение и сокращают потребление воды, а также увеличивают объемную производительность. Затраты на установку и эксплуатацию фотобиореакторов гораздо выше по сравнению с открытыми системами. Тип устройства, обеспечивающего перемешивание культуральной жидкости, играет важную роль в производительности фотобиореактора и в значительной степени влияет на его итоговую стоимость. Циркуляция культуры необходима для предотвращения перемешивания клеток, перепадов температур и pH внутри системы, а также с целью обеспечения распределения питательных веществ и подачи CO₂. Однако чрезмерное перемешивание клеток может приводить к их повреждению и гибели. По этой причине выбор интенсивности циркуляции и типа устройства должен быть опосредован особенностями культивируемого организма. Наиболее распространены два типа фотобиореакторов: трубчатые и плоские. Трубчатые фотобиореакторы состоят из прозрачных трубок, соединенных между собой, где непрерывно прокачивается культура микроводорослей. Как и в любой другой системе, кислород быстро накапливается в результате фотосинтеза, что приводит к стремительному увеличению парциального давления, в связи с чем в этом типе фотобиореактора используют дегазационный сосуд, обеспечивающий его выход. Длина трубок и скорость жидкости в трубчатых фотобиореакторах являются важными конструктивными параметрами, их значения обычно варьируются от 50 до 100 метров для длины и от 2 до 0,5 м/с для скорости потока. Примерами компаний, использующих трубчатые фотобиореакторы, являются AlgaeEnergy (Испания) и Roquette (Германия). Вертикальные панельные фотобиореакторы состоят из прозрачных прямоугольных емкостей высотой от 10 см до 100 см и длиной, которая может составлять десятки метров. Содержимое панелей перемешивается благодаря газации воздухом, который нагнетается по всей длине нижних частей панелей. Несмотря на необходимость в газации, культуру микроводорослей не нужно пропускать через дегазационный сосуд с высокой скоростью, поэтому конечные затраты на энергопотребление существенно ниже, чем в трубчатых фотобиореакторах. Однако масштабирование фотореакторов данного типа является более сложной задачей. На данный момент существующие панельные вертикальные фотобиореакторы представляют собой пилотные системы, занимающие несколько десятков квадратных метров. Примерами компаний,

использующих фотобиореакторы данного типа, являются Ecoduna (Австрия) и Phytolutions (Германия).

Также существует третий тип закрытых систем — ферментеры для гетеротрофного культивирования. Данный способ подходит для некоторых видов микроводорослей, но требует источников органического вещества, что увеличивает затраты и снижает экологичность. Выращивание микроводорослей таким образом предполагает применение стального ферментера объемом до 100 000 л и с плотностью культуры 30–100 г/л.

Для получения сухой биомассы в промышленном производстве задействуют несколько видов сушек. Наиболее простым способом является использование распылительной суши — данный метод предполагает обработку биомассы микроводорослей потоком горячего воздуха. При таком типе суши существует вероятность разрушения белков и витаминов, что, несомненно, ухудшает питательные свойства конечного продукта. Другим, гораздо более приемлемым для пищевой промышленности способом, является лиофильная сушка. Процесс лиофилизации заключается в заморозке биомассы с последующим быстрым испарением воды в безвоздушной среде (под действием вакуума), которое происходит без оттаивания благодаря воздействию низкого давления. Тем самым воздействие вакуума позволяет удалить воду из биомассы без потери ее свойств и исходной структуры. Несмотря на вышеизложенное, на данный момент технологии промышленного производства микроводорослей не являются до конца оптимизированными.

4. Насекомые

4.1. Виды насекомых для использования в пищевой промышленности

Насекомые представляют собой класс беспозвоночных животных, распространенных по всей планете и занимающих самые разнообразные экологические ниши. Употребление насекомых в пищу носит название энтомофагия. Эта практика берет начало с давних времен и особое распространение получила в странах Латинской Америки, Африки и Азии. На сегодняшний день около 2,5 млн человек регулярно принимают насекомых в пищу [28]. Для таких целей используется более 2000 видов из этого класса, среди которых представители отрядов *Coleoptera* (31%), *Orthoptera* (13%), *Hymenoptera* (15%), *Lepidoptera* (18%), *Hemiptera* (11%), *Diptera* (12%), *Odonata* (23%) [29]. Наиболее широкое применение в пищевой промышленности получили *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria*, *Acheta domesticus*. Ввиду способности перечисленных видов синтезировать незаменимые аминокислоты ученые рассматривают их как перспективный альтернативный источник белка.

4.2. Химический состав

Подавляющее большинство насекомых имеет питательную ценность, сопоставимую с обычным мясом. Исследование питательных компонентов более 200 видов насекомых показало, что в основном они состоят из белков и жиров. В Таблице 2 представлены значения уровней белка и жира в традиционной мясной пище животного происхождения в сравнении с одобренными для использования в пищу насекомыми.

Таблица 2. Сравнение массовой доли белка и жира в традиционном мясе и одобренных для применения в пищевых целях насекомых

Table 2. Comparison of mass fractions of protein and fat in traditional meat and insects approved for use with food purposes

	Курица [30]	Говядина [31]	<i>Tenebrio molitor</i> [32]	<i>Locusta migratoria</i> [33]	<i>Acheta domesticus</i> [34]
Белок	22,2%	22,5%	20,3%	50,79%	42–45%
Жир	2,6%	8,7%	13,8%	34,93%	23–29%

Съедобные насекомые соответствуют требованиям ВОЗ по аминокислотному составу, они характеризуются высоким содержанием фенилаланина и тирозина, а также триптофана, лизина и треонина [35]. Наибольшее количество белка содержится в кузнечиках и саранче (*Orthoptera*) и составляет 61% от сухого веса; также высоким показателем белка обладают стрекозы (*Odonata*) — 55% вещества от сухого веса. Наименьшее его содержание в пересчете на сухую массу наблюдается у тараканов и термитов (35%) [36]. Усваиваемость белка насекомых сильно варьируется ввиду того, что часть аминокислот в кутикулярных белках связаны с хитином и компонентами экоскелета. Характеристики белков насекомых могут меняться в зави-

симости от вида насекомого, пола, стадии развития, метода экстракции [37]. Для их выделения используют различные методы, среди которых водная экстракция, сухое фракционирование, щелочная экстракция [38]. Изменения функциональных возможностей белков насекомых в ходе экстракции тесно связаны с изменением гидрофобности поверхности и заряда.

Липиды представляют собой вторую по величине фракцию в составе съедобных насекомых, их содержание составляет от 10% до 50% в пересчете на сухой вес. Для видов, используемых в пищевой промышленности, характерен высокий уровень полиненасыщенных жирных кислот, в особенности линолевой и линоленовой [39]. Извлечение липидов из насекомых с целью получения пищевых масел было исследовано при помощи метода Сокслета и экстракции Фольха [40]. Процесс экстракции не оказывает влияния на жирнокислотный состав, но сильно воздействует на тип получаемых липидов. Например, при использовании водной экстракции выделяются только триацилглицериды. Такой тип экстракции обеспечивает высокое качество масла, аналогичное натуральным. Применение органических растворителей позволяет получать фосфолипиды и глицериды [41].

Насекомые также содержат набор микро- и макроэлементов: кальция, магния, калия, натрия, железа, марганца. Помимо этого, в них присутствуют витамины (рибофлавин, ниацин, кобаламин, А и Е) (Таблица 3).

Таблица 3. Минеральный состав (мг/кг) некоторых видов насекомых, использующихся в пищевой промышленности

Table 3. Mineral composition (mg/kg) of several insect species used in the food industry

Вид	Содержание микроэлементов в насекомых, мг/кг						Источник
	Ca	Mg	K	Na	Fe	Mn	
<i>Tenebrio molitor</i> Мучной хрущак	504,8	2450,8	8212,4	1047,1	98,4	14,2	[42]
<i>Acheta domesticus</i> Домовый сверчок	1261,2	1040,6	13318,5	5125,9	77,7	38,1	[43]
<i>Bombyx mori</i> Тутовый шелкопряд	1023,1	2878,6	18,265,9	2745,6	95,4	24,9	[44]
<i>Gryllus bimaculatus</i> Двупятнистый сверчок	1660,9	1073,8	8607,5	3649,5	81,8	66,3	[45]

Исследования по определению биологической активности съедобных насекомых показали, что они обладают противоопухолевой, антиоксидантной, антидиабетической и противовоспалительной активностью [46]. Таким образом, насекомые имеют не только высокую питательную ценность, но и ряд положительных для человеческого здоровья свойств. Соответственно, возможность их применения в качестве функциональных продуктов питания и фармацевтических материалах возрастает.

4.2. Технологии и применение

На данный момент насекомых употребляют в пищу разными способами: целиком (сырых или приготовленных), обработанных (нераспознаваемая форма в пищевой системе) или в виде экстрактов. Пищевая промышленность проявляет активный интерес к этому новому источнику белка, что характеризуется появлением большого числа проектов, направленных на развитие этого направления, и научных публикаций по данной тематике. Мировой рынок съедобных насекомых в течение 10 лет достигнет 8 млрд долларов [37]. В результате такой экспансии, ориентированной в значительной мере на западную культуру, подходы к приготовлению насекомых должны основываться на таких методах обработки, которые превращают их в неузнаваемую форму, например, в порошок (муку). Некоторые авторы обращают внимание, что при использовании термина «мука из насекомых» необходимо соблюдать осторожность, поскольку это создает ложное впечатление у потребителей [47]. В то время как насекомые состоят преимущественно из белка, жира и хитина, зерновая мука (например, пшеничная) содержит крахмал и клетчатку. Несмотря на химические отличия, технологии производства продуктов на основе злаков оказались хорошо применимы и для насекомых, что позволило включить их в состав различных хлебобулочных и макаронных изделий [48]. Еще одним способом интеграции муки насеко-

мых в пищевые матрицы является отделение белков от хитинового экзоскелета с помощью коммерческих протеаз (например, алкалаза) [49]. В результате получаются белковые гидролизаты, которые улучшают основные функциональные свойства белков — растворимость, эмульгирование, вспенивание.

Для дальнейшего использования в пищевых целях съедобных насекомых сушат. Различные технологии сушки по-разному влияют на их питательный состав и стабильность, в том числе вызывают изменения в содержании белка, жира и клетчатки в *Tenebrio molitor* [50]. Такие сушки, как микроволновая, в псевдоожиженном слое, вакууме, в духовке снижали растворимость белка, в то время как лиофилизация приводила к высокому окислению липидов. Стратегии для оптимизации процесса сушки съедобных насекомых по-прежнему необходимы для обеспечения качества питательных веществ и функциональности продукта.

Использование насекомых в пищевой промышленности одобрило «Европейское управление по безопасности пищевых продуктов» (EFSA). На данный момент EFSA допустило применение в пищу человеком следующих насекомых: мучной хрущак (*Tenebrio molitor*), домовый сверчок (*Acheta domestica*), перелетная саранча (*Locusta migratoria*), мучной хрущак бурый (*Alphitobius diaperinus*). Данные виды считают безопасными и могут использоваться без ограничений от соответствующих производителей, обязанных контролировать качество своей продукции. Наиболее широкое применение они получили в хлебобулочных изделиях и других продуктах на основе злаков (печенье, хлеб, макароны). Например, в результате замены пшеничной муки 5%-ной мукой, полученной из *Acheta domestica*, *Hermetia illucense* и *Tenebrio molitor*, хлебобулочные изделия приобретали улучшенную форму теста и пониженное водопоглощение [51]. Добавление 10–30% муки, полученной из *Acheta domestica*, приводило к более высокой питательной ценности получаемого продукта ввиду более богатого состава жирных кислот и обогащенности незаменимыми аминокислотами: лизином, тирозином, валином.

Несмотря на множество положительных свойств для здоровья и высокую питательную ценность, использование насекомых в качестве альтернативного источника пищи имеет некоторые ограничения. Во-первых, многие люди избегают непривычной пищи и испытывают отвращение от употребления съедобных насекомых [52]. Присутствие изображения насекомого на рекламных постерах значительно снижает желание у потребителей приобретать данный товар [53]. Тем не менее, отношение людей к такому виду пищи постепенно меняется в лучшую сторону. Например, использование в качестве еды обработанных насекомых, превращенных в порошок, снижает негативные ощущения и представляется наиболее перспективным способом энтомофагии. Так, потребители демонстрировали более положительную эмоциональную реакцию на пищевые продукты, в составе которых содержались насекомые в нераспознаваемой

форме (в виде муки), по сравнению с теми продуктами, где насекомые присутствовали в видимой форме [54]. Во-вторых, основным фактором, определяющим включение съедобных насекомых в рацион человека, является безопасность. В некоторых исследованиях сообщалось о загрязнении съедобных насекомых тяжелыми металлами [55]. В кишечнике насекомых могут продуцироваться микотоксины, вызывающие острые и хронические заболевания [56]. Еще одним риском, связанным с энтомофагией, является аллергенность. У насекомых выявлено более 200 аллергенов, преимущественно являющихся белками. Среди них встречаются мышечные белки (тропомиозин, актин, миоцин) и ферменты (аргининкиназа, фосфолипаза А) [52]. В литературе описаны случаи аллергических реакций, связанных с употреблением в пищу насекомых [57]. Тем не менее различные методы обработки позволяют повысить безопасность конечного продукта. Например, способы, использующиеся в традиционных пищевых отраслях, такие как пастеризация и промышленная стерилизация, значительно снижают микробную нагрузку, повышают усвояемость и питательные свойства продукта, инактивируют ферменты [58]. Исследования, проведенные на *Tenebrio molitor* и *Acheta domestica*, показали, что термическая обработка оказалась эффективной в уничтожении бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [59]. Традиционные методы обработки, такие как отваривание или кипячение позволяли устранить золотистый стафилококк, сальмонеллу, плесневые грибы и дрожжи в микробиологическом составе *Hermetia illucense*, *Tenebrio molitor*, *Acheta domestica* [60].

5. Выводы

Возрастающие проблемы человечества, связанные с перенаселением планеты, сокращением земельных и водных ресурсов, голодом в некоторых странах актуализируют поиск альтернативных источников питания. Они должны не только обладать необходимым для развития и жизни человека набором питательных компонентов, но и иметь возможность снизить негативное влияние на окружающую среду. На сегодняшний день основной фокус исследований по данной проблеме направлен на две группы организмов — на насекомых и микроводорослей. В этом обзоре рассмотрен их химический состав, применение, технологии получения, а также возможные риски, связанные с употреблением их в пищу. На данный момент известно, что насекомые и микроводоросли характеризуются высоким содержанием белка, витаминов, полиненасыщенных жирных кислот, антиоксидантов, что благоприятно влияет на здоровье человека. Включение насекомых и микроводорослей в пищевые матрицы способно улучшить питательные свойства продукта, увеличить экономическую выгоду, при этом снизив неблагоприятное воздействие на окружающую среду. Развитие данной области исследований может решить вопрос глобальной продовольственной безопасности и значительно уменьшить негативную нагрузку на окружающую среду.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. United Nations (2022). Revision of world population prospects. Retrieved from <https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/keyfindingswpp2015.pdf>. Accessed June 2, 2023.
2. Alexandratos, N., Bruinsma, J. (2012). World Agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. Working paper No. 12–05. Rome, FAO, 2012.
3. Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J. et al (2013). Tackling climate change through livestock — A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 2013.
4. Beusen, A. H. W., Bouwman, A. F., Heuberger, P. S. C., Van Drecht, G., Van Der Hoek, K. W. (2008). Bottom-up uncertainty estimates of global ammonia emissions from global agricultural production systems. *Atmospheric Environment*, 42(24), 6067–6077. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.03.044>
5. Eisler, M. C., Lee, M. R. F., Tarlton, J. F., Martin, G. B., Beddington, J., Dungait, J. A. J. et al. (2014). Agriculture: Steps to sustainable livestock. *Nature*, 507(7490), 32–34. <https://doi.org/10.1038/507032a>
6. Hedenus, F., Wirsén, S., Johansson, D. J. A. (2014). The importance of reduced meat and dairy consumption for meeting stringent climate change targets. *Climatic Change*, 124 (1–2), 79–91. <https://doi.org/10.1007/s10584-014-1104-5>
7. Dittami, S. M., Heesch, S., Olsen, J. L., Collén, J. (2017). Transitions between marine and freshwater environments provide new clues about the origins of multicellular plants and algae. *Journal of Phycology*, 53(4), 731–745. <https://doi.org/10.1111/jpy.12547>
8. Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A. P., Sousa, I., Empis, J. (2006). *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 362–367. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0105-z>
9. Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Taher, M., Khan, S., Mahata, C. et al. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*, 341, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.003>
10. Zhuang, D., He, N., Khoo, K. S., Ng, E.-P., Chew, K. W., Ling, T. C. (2022). Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. *Chemosphere*, 291, Article 132932. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132932>
11. Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F. et al. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource Technology*, 301, Article 122804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>
12. Mutum, L., Janda, T., Ördög, V., Molnár, Z. (2022). *Biologia Futura*: potential of different forms of microalgae for soil improvement. *Biologia Futura*, 73(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s42977-021-00103-2>
13. Gellenbeck, K. W. (2012). Utilization of algal materials for nutraceutical and cosmeceutical applications — what do manufacturers need to know? *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 309–313. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9722-z>
14. FAO (2021). Global seaweeds and microalgae production, 1950–2019 WAPI factsheet to facilitate evidence-based policy-making and sector management in aquaculture. Retrieved from <https://www.fao.org/3/cb4579en/cb4579en.pdf>. Accessed June 10, 2023.
15. Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., Sijtsma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: An outlook for Europe. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2014. <https://doi.org/10.2791/3339>
16. Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33 (2), 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
17. Fernández, F. G. A., Reis, A., Wijffels, R. H., Barbosa, M., Verdelho, V., Llamas, B. (2021). The role of microalgae in the bioeconomy. *New Biotechnology*, 61, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.011>
18. Andrade, L. M., Andrade, C. J., Dias, M., Nascimento, C. A. O., Mendes, M. A. (2018). *Chlorella* and *Spirulina* microalgae as sources of functional foods, nutra-

- ceuticals, and food supplements; an overview. *MOJ Food Processing and Technology*, 6(1), 45–58. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00144>
19. Chisti, Yu. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
 20. Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Deprá, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., Zepka, L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 25, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.003>
 21. McCann, J. C., Ames, B. N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 281–295. <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.2.281>
 22. Soares, A. T., Marques Júnior, J. G., Lopes, R. G., Derner, R. B., Antoniosi Filho, N. R. (2016). Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *Desmodesmus* sp. microalgae. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6), 1083–1093. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160004>
 23. Mohammed, M. K., Mohd, M. K. (2011). Production of carotenoids (antioxidants/colourant) in *Spirulina Platensis* in response to indole acetic acid (IAA). *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 3(6), 4973–4979.
 24. Woodside, J. V., McGrath, A. J., Lyner, N., McKinley, M. C. (2015). Carotenoids and health in older people. *Maturitas*, 80(1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.10.012>
 25. Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A. et al. (2018). Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11), Article 2436. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>
 26. Barzkar, N., Jahromi, S. T., Poorsaheli, H. B., Vianello, F. (2019). Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: Immense scope for pharmacology. *Marine Drugs*, 17(8), Article 464. <https://doi.org/10.3390/md17080464>
 27. Milledge, J. (2012). Microalgae — Commercial potential for fuel, food and feed. *Food Science and Technology*, 26(1), 26–28.
 28. van Huis, A. (2017). Did early humans consume insects? *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(3), 161–163. <https://doi.org/10.3920/JIFF2017.x006>
 29. Liceaga, A. M. (2022). Edible insects, a valuable protein source from ancient to modern times. Chapter in a book: *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Academic Press Inc., London, UK; San Diego, CA, USA; Cambridge, MA, USA; Kidlington, Oxford, UK. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.002>
 30. National Nutrient Database for Standard reference: report 05062 Chicken. (2019). Retrieved from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171077/nutrients>. Accessed June 15, 2023.
 31. National Nutrient Database for Standard Reference: Report 23572 Beef, Ground, 80% Lean Meat /20% Fat, Raw. (2023). Retrieved from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2514744/nutrients>. Accessed June 15, 2023.
 32. Liceaga, A. M., Aguilar-Toalá, J. E., Vallejo-Córdova, B., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A. (2022). Insects as an alternative protein source. *Annual Review of Food Science and Technology*, 13(1), 19–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-052720-112443>
 33. Clarkson, C., Miroso, M., Birch, J. (2018). Potential of extracted *Locusta* Migratoria protein fractions as value-added ingredients. *Insects*, 9(1), Article 20. <https://doi.org/10.3390/insects9010020>
 34. Montowska, M., Kowalczewski, P. Ł., Rybicka, I., Fornal, E. (2019). Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food Chemistry*, 289, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.062>
 35. Nsevolo Miankeba, P., Taofic, A., Kiatoko, N., Mutiaka, K., Francis, F., Caparros Megido, R. (2022). Protein content and amino acid profiles of selected edible insect species from the Democratic Republic of Congo relevant for transboundary trade across Africa. *Insects*, 13(11), Article 994. <https://doi.org/10.3390/insects13110994>
 36. Liceaga, A. M. (2021). Processing insects for use in the food and feed industry. *Current Opinion in Insect Science*, 48, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.08.002>
 37. Kim, T.-K., Cha, J. Y., Yong, H. I., Jang, H. W., Jung, S., Choi, Y.-S. (2022). Application of edible insects as novel protein sources and strategies for improving their processing. *Food Science of Animal Resources*, 42(3), 372–388. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e10>
 38. Melgar-Lalanne, G., Hernández-Álvarez, A., Salinas-Castro, A. (2019). Edible insects processing: Traditional and innovative technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1166–1191. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12463>
 39. Anankware, J. P., Roberts, B. J., Cheseto, X., Osuga, I., Savolainen, V., Collins, C. M. (2021). The nutritional profiles of five important edible insect species from West Africa — An analytical and literature synthesis. *Frontiers in Nutrition*, 8, Article 792941. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.792941>
 40. Purschke, B., Stegmann, T., Schreiner, M., Jäger, H. (2017). Pilot-scale supercritical CO₂ extraction of edible insect oil from *Tenebrio molitor* L. larvae — Influence of extraction conditions on kinetics, defatting performance and compositional properties. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(2), Article 1600134. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600134>
 41. Tzompa-Sosa, D. A., Yi, L., van Valenberg, H. J. F., van Boekel, M. A. J. S., Lakemond, C. M. M. (2014). Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International*, 62, 1087–1094. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.052>
 42. Ghosh, S., Lee, S.-M., Jung, C., Meyer-Rochow, V. B. (2017). Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20 (2), 686–694. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.003>
 43. Rumpold, B. A., Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
 44. Wang, J., Wang, C., Zhao, M., He, Z., Sun, L., Feng, Y. (2019). Contents of mercury and selenium in common edible and medicinal insects in Yunnan and their correlation analysis. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 34(6), 1033–1040. [https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201903014](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201903014) (In Chinese)
 45. He, Z., Sun, L., Wang, C. Y., Feng, Y., Zhao, M. (2021). Nutritional composition analysis and evaluation of the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae). *Biotic Resources*, 3, 303–308. <http://doi.org/10.14188/j.ajsh.2021.03.012> (In Chinese)
 46. Lee, J. H., Kim, T.-K., Jeong, C. H., Yong, H. I., Cha, J. Y., Kim, B.-K. et al. (2021). Biological activity and processing technologies of edible insects: a review. *Food Science and Biotechnology*, 30(8), 1003–1023. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00942-8>
 47. Dossey, A. T., Tatum, J. T., McGill, W. L. (2016). Modern Insect-Based Food Industry: Current Status, Insect Processing Technology, and Recommendations Moving Forward. Chapter in a book: *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Elsevier Academic Press Inc., London, UK; San Diego, CA, USA; Cambridge, MA, USA; Kidlington, Oxford, UK, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802856-8.00005-3>
 48. Carcea, M. (2020). Quality and nutritional/textural properties of durum wheat pasta enriched with cricket powder. *Foods*, 9(9), Article 1298. <https://doi.org/10.3390/foods9091298>
 49. Liceaga, A. M. (2019). Approaches for utilizing insect protein for human consumption: Effect of enzymatic hydrolysis on protein quality and functionality. *Annals of the Entomological Society of America*, 112(6), 529–532. <https://doi.org/10.1093/aesa/saz010>
 50. Kröncke, N., Bösch, V., Woyzichowski, J., Demtröder, S., Benning, R. (2018). Comparison of suitable drying processes for mealworms (*Tenebrio molitor*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 50, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.009>
 51. Schlüter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., Vogel, R. F., Quasigroch, W. et al. (2017). Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(6), Article 1600520. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600520>
 52. Ruby, M. B., Rozin, P., Chan, C. (2015). Determinants of willingness to eat insects in the USA and India. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(3), 215–225. <https://doi.org/10.3920/JIFF2015.0029>
 53. Baker, M. A., Shin, J. T., Kim, Y. W. (2016). An exploration and investigation of edible insect consumption: The impacts of image and description on risk perceptions and purchase intent. *Psychology and Marketing*, 33 (2), 94–112. <https://doi.org/10.1002/mar.20847>
 54. Gmuer, A., Guth, J. N., Hartmann, C., Siegrist, M. (2016). Effects of the degree of processing of insect ingredients in snacks on expected emotional experiences and willingness to eat. *Food Quality and Preference*, 54, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.07.003>
 55. Kitahara, Y., Nomura, H., Nishihara, N., Ueda, T., Watanabe, S., Saito, I. et al. (2022). Survey of arsenic/heavy metals and pesticide residues in edible insects for human consumption or supplied in Japan. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 63 (4), 136–140. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.63.136> (In Japanese)
 56. Evans, N. M., Shao, S. (2022). Mycotoxin metabolism by edible insects. *Toxins*, 14(3), Article 217. <https://doi.org/10.3390/toxins14030217>
 57. Kamemura, N., Sugimoto, M., Tamehiro, N., Adachi, R., Tomonari, S., Watanabe, T. et al. (2019). Cross-allergenicity of crustacean and the edible insect *Gryllus bimaculatus* in patients with shrimp allergy. *Molecular Immunology*, 106, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.015>
 58. Agbemafle, I., Hadzi, D., Amagloh, F. K., Zotor, F. B., Reddy, M. B. (2020). Nutritional, microbial, and sensory evaluation of complementary foods made from blends of orange-fleshed sweet potato and edible insects. *Foods*, 9(9), Article 1225. <https://doi.org/10.3390/foods9091225>
 59. Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M., Nout, M. J. R. (2012). Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26(2), 628–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.013>
 60. Nyangena, D. N., Mutungi, C., Imathiu, S., Kinyuru, J., Affognon, H., Ekesi, S. et al. (2020). Effects of traditional processing techniques on the nutritional and microbiological quality of four edible insect species used for food and feed in East Africa. *Foods*, 9(5), Article 574. <https://doi.org/10.3390/foods9050574>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Сутула Глеб Игоревич — младший научный сотрудник, лаборатория промышленных биотехнологических инноваций, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок 191014, Санкт-Петербург, Литейный проспект, 55 Тел.: +7-812-273-75-24 E-mail: capitals2016@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0009-0002-2781-9035 * автор для контактов	Gleb I. Sutula, Junior Researcher, Laboratory of Industrial Biotechnological Innovations, All-Russia Research Institute for Food Additives 55, Liteyny Prospekt, Saint Petersburg, 191014, Russia Tel.: +7-812-273-75-24 E-mail: capitals2016@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0009-0002-2781-9035 * corresponding author
Рябухин Дмитрий Сергеевич — кандидат химический наук, заведующий лабораторией промышленных биотехнологических инноваций, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок 191014, Санкт-Петербург, Литейный проспект, 55 Тел.: +7-812-273-75-24 E-mail: d.ryabukhin@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5345-0038	Dmitry S. Ryabukhin, Candidate of Chemical Sciences, Head of Laboratory of Industrial Biotechnological Innovations, All-Russia Research Institute for Food Additives 55, Liteyny Prospekt, Saint Petersburg, 191014, Russia Tel.: +7-812-273-75-24 E-mail: d.ryabukhin@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5345-0038
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-504-511>



Received 17.07.2023

Accepted for revised 28.11.2023

Accepted for publication 01.12.2023

© Dovganeva Y. A., Katrashova Y. V., Kirillova T. V., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

THE ECOSYSTEM OF VERTICAL FARMS: A CONCEPTUAL FRAMEWORK

Yuliya A. Dovganeva, Yuliya V. Katrashova*, Tatyana V. Kirillova

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

KEY WORDS:
vertical farms,
agro-industrial
complex, digital
technologies

ABSTRACT

The article discusses the prospects of creating vertical farms as a modern eco-friendly solution to increase the productivity of the agro-industrial complex. Throughout the work, the authors justify the need to switch from the old model of food security to a new one, which is based on innovative agricultural technologies. In particular, the nature of vertical farms, their organization models, as well as their relevance for the "smart city" concept are considered. The paper discusses the ecosystem of vertical farms and the role of various stakeholders. The importance of vertical farms for digital transformation of agriculture is demonstrated.

Поступила 17.07.2023

Поступила после рецензирования 28.11.2023

Принята в печать 01.12.2023

© Довганёва Ю. А., Катрашова Ю. В., Кириллова Т. В., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

ЭКОСИСТЕМА ВЕРТИКАЛЬНЫХ ФЕРМ: КОНЦЕПТУАЛЬНАЯ ОСНОВА

Довганёва Ю. А., Катрашова Ю. В.,* Кириллова Т. В.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

В статье рассматриваются перспективы создания вертикальных ферм как современного экологичного способа повышения производительности агропромышленного комплекса. В работе авторы обосновывают необходимость перехода от старой модели продовольственной безопасности к новой модели, основанной на инновационных агротехнологиях. В частности, рассмотрены сущность вертикальных ферм, модели их организации, а также их соответствие концепции «умного города». В статье обсуждается экосистема вертикальных ферм и роль различных заинтересованных сторон. Показана важность вертикальных ферм для цифровой трансформации сельского хозяйства.

1. Introduction

While the existing models of agricultural production that emerged after the first Green Revolution [1,2] have demonstrated a high level of efficiency due to application of advanced biotechnologies, digital technologies, innovative models of management and international division of labor, their ability to ensure sustainable and resilient food security for the global population in the present economic, social, and geopolitical situation is still under question:

- Food supply chains include companies from many countries and depend on unhindered movement of goods between these countries. However, the recent events (pandemics of COVID-19 [3], special military operation in Ukraine [4] etc) demonstrated that these food supply chains have a low level of resilience against those shocks and may not be able to provide people with sustainable access to food in case of crisis [5] (as was shown by rationing of basic foods in Europe during pandemics customers' rush [6]).
- People are interested in replacing (or complementing) the global food supply chains by alternative food networks that connect the local producers and the local customers [7]. This interest is supported by customers' willingness to support local agriculture, to improve the quality of food they buy and to get access to food that is absent in food retail chains (including food that corresponds to changing values of customers) [8,9,10];
- The world population keeps growing, as a result, the area of agricultural land per person decreases [11,12]. For this reason, to ensure food security it is necessary to use the limited land resources as efficiently as possible [5,12,13];
- The existing models of agricultural production create a pressure on environment thus leading to its pollution [14,15,16], land degradation [17], risks for biodiversity [18] etc. Moreover, the models of food chains management have a negative social impact (dispossession of farmers [19], destruction of rural environment [20], demographic shifts [21] that cannot be neglected. Taking into account the growing importance of ecological and social values for the customers (and for the society in general) these negative effects lead to a demand

for innovative models of food production and management of food systems [22].

It means that global food supply chains should be complemented and partially replaced by the alternative models of food production and distribution that would contribute to both higher productivity of land resources [11] (due to innovative technological solutions including precision agriculture [23], smart agriculture [24,25], introduction of new edible resources (insects etc. [26,27]), cultured meat [28,29,30] and cellular agriculture [31], genome engineering [24] etc.) and higher resilience of food chains (achieved by reducing the distance between the producers and the consumers in order to reduce the risks of food supply chains shocks [32,33,34]). Special attention should be paid to local food systems, as in addition to a higher resilience they can provide local customers with guaranteed access to locally grown high quality fresh food [34]. Sustainability of new food chains is also an important requirement as people's awareness of ecological values is constantly growing [8,10,35].

One of the ways to reach these goals can be introduction of so called, urban agriculture that can be described as agricultural production situated within the cities and peri-urban areas [36,37,38]. While urban agriculture is a centuries-old practice, it has traditionally been limited to individual producers who grew vegetables, poultry etc. at home [39] or on the small land plots provided by the city authorities [40]. This model of urban agriculture (in general being the form of subsistence agriculture) is oriented towards the consumption of the products by the growers [41,42]. However, thanks to technological, social and organizational development the new forms of urban agriculture emerge (community gardens [43,44], urban farms [45], rooftop farming etc. [46]) that help overcome inefficiencies of traditional agriculture [45], increase resilience and outreach of food security systems (by eliminating food deserts [47], thus providing people in need with affordable food [48,49], protecting food supply chains against shocks [50]) and create positive social and ecological effects [23,51,52]. One of these forms is the vertical farms [53,54,55].

Vertical farms, which are often called as urban farms or indoor farms [56], are the agro-industrial facilities in the cities and peri-urban areas consisting of vertically arranged tiers of certain substrate assigned for

FOR CITATION: Dovganeva, Y. A., Katrashova, Y. V., Kirillova, T. V. (2023). The ecosystem of vertical farms: A conceptual framework. *Food systems*, 6(4), 504-511. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-504-511>

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Довганёва, Ю. А., Катрашова, Ю. В., Кириллова, Т. В. (2023). Экосистема вертикальных ферм: концептуальная основа. *Пищевые системы*, 6(4), 504-511. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-504-511>

growing plants and (or) animals (mainly mariculture, however, there are also the urban farms for other species) [54,55,57]. This model of organization of agricultural production supports the idea of intensive use of space as due to this method the minimal space gives high yield productivity and helps maintain an optimal microclimate [11,12,55]. Vertical farms represent a new stage of development of urban agriculture as they are based on large and highly automated agro-industrial facilities located within the cities [58,59]. High intensity of space usage is based on hydroponic and aeroponic technologies [12,55,60].

Currently, there is a significant number of publications on the vertical farms that can be divided into the following research streams [63,64,65]:

Technological aspects of the vertical agriculture [12,55,59]. The goal of this research stream is to determine key technologies that can be used for vertical agriculture and to evaluate their advantages and disadvantages [56,60]. It is important to highlight that despite the growing popularity of vertical farms, the scientists raise concerns about their real efficiency as the technologies of vertical farming may be still immature [61] and the energy consumption is high [62];

Role of vertical agriculture for urban food security [53,63,64]. As the current level of geopolitical, ecological, climatic, economic and social risks is very high, it is extremely important to ensure resilience of food supplies to the cities;

Organizational and economic tools that can be used in order to ensure efficiency of vertical farms [65]. Being innovative players on agricultural market, urban farms may be associated with higher risks in comparison with the traditional agricultural businesses [65]. Finding the ways to ensure their efficiency and selection of tools of elimination of risks is crucial for development of vertical agriculture;

Environmental effects of the urban farms [66,67]. Ecological values play an important role for modern society as they comprise a part of ESG-transformation [8,10]. Innovative models of agriculture have to comply with these values.

Nevertheless, two issues remain relatively poorly studied:

- the system of relations between the participants of the ecosystem of vertical agriculture. Expansion of the vertical agriculture means that new stakeholders in agricultural industry emerge, and the system of relations between the existing stakeholders and the new stakeholders is constantly changing. Understanding these changes is essential in order to implement the state and corporate strategies of development of the vertical agriculture as a new element of urban food security. However, despite the popularity of ecosystem approach for analysis of companies, industries and markets, the literature on vertical farms does not consider this approach. The study of linkages between the vertical farms and external actors usually includes only cooperation between the operators of vertical farms and technology providers [56]. Obviously, it is possible to provide conditions for the development of the vertical agriculture only on the basis of understanding of the goals and the conflicts of stakeholders of the vertical farms ecosystem;
- the role of vertical farms in digital transformation of agriculture [25,68]. While vertical farms strongly depend on digital technologies, these technologies are only analyzed as a technological basis of the vertical farms [12,55,59]. However, being an innovative form of agricultural production, the vertical farms can also contribute to digital transformation of agriculture [68,69]. Moreover, as vertical farms are situated within the cities and peri-urban areas they can be considered as a tool of social transition towards smart cities [70,71,72]. This aspect is extremely important as putting vertical farms in the context of the digital transformation of global economy will help increasing efficiency of the vertical farms by linking them to the other digital systems.

The present paper represents an attempt at filling in these gaps. The goal of the research is twofold:

- Identification of the composition of the vertical agriculture ecosystem and the description of interests, goals and conflicts of its stakeholders.
- Analysis of the role of vertical farms in the digital transformation of economy.

The contribution of the present research to the existing literature on vertical agriculture is made up of identification of potential models of pooling resources of various stakeholders to promote the vertical farms as an innovative model of agricultural production.

2. Objects and methods

The present research is based on ecosystem approach. The concept of ecosystems as a model of organization of business activities was introduced by Moore [73]. Ecosystems exist at the project, in the corporate and industrial level, and can be broadly defined as the open networks of various stakeholders that have common and private interests and who

influence the development of this project (business, industry etc.). The balance of the common and private interests of various groups of stakeholders leads to a cooperation among them.

Concept of ecosystems has been successfully applied to analysis of various economic objects (platforms [74], fintech [75], cryptocurrencies [76], cities [77] and helped to understand the structure of stakeholders concerned in these objects, the nature of their relations as well as their impact on the development of these objects [78]. It means that ecosystem approach is a powerful research methodology and can be applied to analysis of vertical farms industry.

Stakeholders are the groups of economic agents with more or less uniform interests, goals and models of participation in economic activities (and similar model of interaction with the economic object under analysis).

In order to identify the specific groups of stakeholders in the vertical agriculture we use the general method of analysis and synthesis. For description of the impact of the vertical farms on digital transformation of agriculture we use the method of strategic matrices [79].

3. Results and discussion

3.1. Advantages of the vertical farms

Vertical farms feature many advantages in comparison with traditional agriculture:

- More efficient use of limited land resources due to vertical arrangement of production facilities, as vertical farms are multi-floor buildings [12].
- Vertical farms are less dependent on climatic conditions [80] because of internal microclimate supported by special technological equipment [60]. Thanks to independence from climatic conditions the vertical farms can be used for organization of agricultural production in area where traditional agriculture is impossible [81,82]. These measures will ensure food security of these areas. It also helps increase efficiency as multiple production cycles can take place all year round. Finally, it helps to reduce the negative effects of climate change [80,83].
- Better food supply for the cities [53,54,84]. Vertical farms can be located within the urban areas thus eliminating the distance between the place of production of food and the place of its consumption which makes food supplies more resilient.
- Shorter food supply chains of retail operators and lower logistic costs for retail chains.
- Lower environmental damage (less fertilizers, lower water consumption, less fuel for transportation, no deforestation) [54]. However, according to Vaughan [85], ecological effects of vertical agriculture are unclear.
- Promotion of organic consumption.
- Rehabilitation of urban landscape. Since the cities have a large number of abandoned buildings and territories (due to deindustrialization), it is possible to consider these resources as a place to create vertical farms, which will improve the quality of the urban environment.

Development of the vertical farms corresponds to main trends of evolution of agriculture:

- Expansion of green agriculture (that is more environment friendly than the existing model of agricultural production). Ecological values become more important for customers [8,86]. In the same time the legal pressure on business that do not care about the environment is constantly getting harder. Producers of food have to comply with these requirements and development of vertical agriculture is a good option.
- Urban agriculture which encompasses various forms of growing food in cities organized by companies, communities and individuals (like urban gardening). Urban agriculture helps to improve the quality of food and to increase the efficiency of use of city lands.
- Smart agriculture as vertical farms are very much dependent on digital technologies that control and optimize all processes.

It means that in addition to being an innovative model of ensuring food security the vertical agriculture plays a strong transformative role for the customers, food producers and cities as it promotes new models of land use, production of food and interactions within the framework of food consumption.

3.2. Vertical farms as a tool for the development of the smart city concept

Vertical farms are mainly attractive for megacities that historically have been the industrial centers:

1. Megacities depend on external food supplies (since it is economically impractical to grow food in the cities within the framework of the traditional agricultural production model). This provides a negative impact on their food security.

2. In the old industrial centers after deindustrialization there are many abandoned or underused buildings remaining from the former production facilities, as well as adjacent land plots. They are usually used for the construction of residential and commercial real estate, but this leads to a higher occupational density and to deterioration of the urban environment quality.

The construction of the vertical farms allows solving these problems, since they create an opportunity for growing agricultural food products within the city (which favorably affects the supply of food to the cities [5]), and some forms of vertical farms may lead to greening of the cities.

Since vertical farms are based on the active use of digital technologies, they can be easily integrated into a single digital food management system of “smart cities” — a new model of urban management and general governance [87]. Thus, vertical farms correspond to new approaches to urban management based on use of the digital tools [72,88,89]. They can also be easily included into the digital systems of food security that ensure seamless connection between the producers, retail sale chains and the end users.

It means the role of the vertical farms cannot be limited only to direct supplies of fresh food within the cities (without necessity of creation of long supply chains which connect the cities and agricultural areas). Vertical farms also contribute to transformation of urban environment and urban management:

- They help rehabilitate the abandoned industrial buildings by organizing agricultural production there.
- Vertical farms may create green areas within cities. It improves the quality of life of urban population.
- Urban agriculture becomes an integral part of smart cities' management systems. It fosters digital transformation of cities.

It demonstrates the multi-dimensional role of vertical farms in transformation of the cities. It also shows that the owners of former urban industrial sites as well municipal authorities are the active stakeholders of the vertical farm's ecosystems.

3.3. Ecosystem of vertical farms

Vertical farms represent a sub-industry of urban agriculture. It means that the ecosystem of vertical farms is an industrial ecosystem.

According to the classical approach developed by Moore [73] an industrial ecosystem consists of the producers (who make up the core of the industry), the suppliers (both direct and indirect), the competitors and the customers. This approach was developed in further research in order to adapt it to specific industries and to provide more complex view by including the additional groups of the stakeholders [75,76]. Defining the structure of vertical farms ecosystem means adaptation of this general model of industrial ecosystems to the specific features of the vertical farms.

Ecosystem approach to the analysis of industries and analysis of markets has gained its popularity in the scholarly literature and demonstrated its high efficiency for understanding of interactions between the stakeholders in various industries [74,77,90]. Applying this approach towards vertical farms may extend our knowledge of potential conflicts as well as raises the awareness on the models of cooperation between various stakeholders of the vertical farms and contribute to creating a basis for the strategy of development of the vertical farms within the frames of smart cities.

In our opinion this ecosystem can include the following (Table 1):

1. Vertical farm operators are companies that invest in the creation of city farms and then run them. This group of stakeholders constitutes the core of the vertical farms industry. These enterprises generate profit by supplying fresh and higher quality products to the customers. They create value for all other groups of stakeholders of this ecosystem (or, better, they have an impact on the value captured by the other stakeholders). However their development is threatened by the high costs of creating and running the vertical farms (associated with a higher cost of land within the city, as well as booming high electricity costs), and, as a result, the possible lower investment attractiveness of such projects.

According to economic calculations provided by iFarm, investments into vertical farms are almost three times higher than investments into the traditional greenhouses of the 4th or 5th generation (<https://ifarm-project.ru/technologies#vertical>) as their payback period is about 4.3–4.7 years. Vertical farms can be profitable in the big cities only (like Moscow or St. Petersburg).

Operators of the vertical farms have two main groups of the rivals that compete for the investments:

- residential and commercial real estate projects as an alternative option for using urban land. These projects are well known to the investors who are able to evaluate their potential profitability and risks. To the contrary, the vertical farms are a new industry which, despite its high

potential, still has unclear prospects. Risk-averse investors may not wish to invest their funds into the vertical farms and would prefer to invest them into the residential and commercial real estate;

- traditional (non-vertical agricultural projects. Traditional agriculture is more transparent for the potential investors in comparison with the vertical farms.

Another problem is that vertical farms are the new companies that still have to create and promote their brands (being surrounded by strong competition with traditional agricultural producers brands). It also decreases the attractiveness of vertical agriculture for investors, which may complicate access to financing. Another factor that hinders the development of vertical farms in Russia is unfavorable legislation. Vertical farms are not considered as the agricultural companies and they have no state support.

Finally, operators of the vertical farms may face a shortage of qualified personnel;

2. Manufacturers of equipment and software for the vertical farms, as well as the developers of projects of such farms and management companies. They are interested in the possibility of making profit from working in a new promising market. These stakeholders face the fact that the growth rates of the vertical farming industry may be lower than they expected.

3. Utilities companies (electric power, water supply etc., as well as those engaged in disposal of agricultural waste). Formally they should be included in the previous group of stakeholders (the suppliers of resources for vertical farms). However, electric power and water are key resources that are necessary for vertical agriculture, and relations between vertical farm operators and utilities companies are often based on non-market basis. Utilities companies are often monopolists and their prices can be established for all groups of the customers. In addition, their supply is stable and inflexible and it may be difficult for these companies to serve the new customers. Actually, the vertical farms may create an additional load for electric power and water supply infrastructure. In the same time the vertical farms may be the good customers for utilities companies as the vertical farms have a stable demand for resources which helps the utilities companies to avoid peaks of consumption.

It is extremely important for vertical farm operators to establish the collaboration with utilities companies and to negotiate good terms.

4. Industrial customers of agricultural products — retail chains and food industry enterprises. The attractiveness of the vertical farming concept for this group of stakeholders is due to the fact that they can simplify their logistics chains, ensure the stability of supplies throughout the year and improve the quality of purchased products (due to the absence of the need for long-term storage and transportation). Negative factors are associated with the possibility of rising prices for the products of vertical farms in comparison with traditional suppliers because of high investments (however, this is offset by the possibility of increasing retail prices for it due to the formation of the image of these products as having better quality).

5. Traditional agricultural producers. On the one hand, vertical farming poses a threat to them, since it is a new model of agricultural organization that competes with traditional models and has important advantages in comparison with them (lower logistics costs and higher product quality) [57]. On the other hand, investing into vertical farms can provide these companies with an opportunity to diversify their business, and due to a stable market position and large financial resources, these enterprises can effectively compete with specialized vertical farm operators. This competition can occur on two levels. First, traditional companies have well-established logistics chains, good connections with retail chains and the ability to supply large volumes of food, and therefore the food products they produce in the traditional way can maintain their competitiveness in comparison with food supplied by vertical farm operators. Second, traditional agricultural companies have the opportunity to invest large resources in vertical farms (including acquisition of their operators) in order to diversify their activities.

6. Land owners who control the access of farms to a key resource. The transition to vertical farms will allow them to diversify models of land management and reduce risks, but, on the other hand, the profitability of vertical farm projects may be lower than alternative projects implemented in cities, which will reduce the income of owners.

7. End consumers (and, more generally, city citizens) interested in having access to quality food (but not willing to pay too high a price for them) [39]. In the same time urban population may not like transformation of areas where they live into large agro-industrial facilities as it may cause harm to the comfort of the city environment;

8. City administration that seeks ways to optimize the usage of urban land, to increase food security and to diversify city economy (all these problems can be solved thanks to introduction of vertical farms). However, city farms may create an additional load on the city infrastructure. It may also hinder transition to post-industrial creative cities. In

Table 1. **Risks and benefits of building vertical farms**
Таблица 1. Риски и преимущества создания вертикальных ферм

	Benefits	Risks
For hardware and software manufacturers	— Development of a new technology sales market	— The new market may not be promising enough
For vertical farm operators	— Reduction of wage costs — Water saving up to 90% — Stable harvest — Attracting investments by popularizing the trend of greening — Increase in profits	— Expensive equipment and high operating costs — High electricity costs — Lack of qualified personnel — Possible lower investment attractiveness compared to residential and commercial real estate projects (during the construction of farms within the city)
For utilities companies	— Supply of resource to customers with stable demand; — Cooperation with customers with a high demand (that generates high revenues)	— Additional burden on power and water infrastructure (that may undermine stability of supplies to other customers)
For retail chains and food industry enterprises	— Reduction of transportation costs — Simple logistics chains — Stability of supplies — High-quality locally produced products (which can be used in a marketing strategy)	— The capacity of the farm is insufficient to provide large retail chains — It is advisable to sell products exclusively on the local market
For traditional agricultural companies	— Diversification of production — Well-organized logistics chains — Stable connections with retail chains — Opportunity to invest in vertical farms (absorb competitors)	— Decrease in demand for manufactured products — The threat of displacement from the market
For land owners	— Diversification of the direction of land — Rational use of land resources	— The profitability of vertical farm projects may be lower than alternative projects — Possible decrease of income
For the population (end users)	— Improving the quality of food supply — Transition to organic consumption model — Improving the welfare of citizens by improving the quality of products supplied	— Risks of relatively higher price for the products of vertical farms; — Re-industrialization of cities may harm the urban environment
For city council (municipal authorities)	— Higher food security; — Diversification of urban economy; — Expansion of smart city system	— Load on city infrastructure; — Problem of transition to creative cities; — Low number of jobs created (in comparison to service and creative industries) because of high level of automation of vertical farms
For the state	— Development of the “smart city” concept — Solving the problem of lack of fertile land — Improving the food security situation — Landscaping and land reclamation (on the site of old industrial enterprises) — Improving the efficiency of agriculture	— Depopulation of rural areas — Threat to social stability — High level of consolidated budget expenditures to support the development of vertical farm startups and scientific research in the field of agriculture and technology, as well as to eliminate the negative consequences of depopulation

comparison with creative industries, vertical farms may create less job places (due to a high level of automation) which is a disadvantage from the point of view of local authorities.

9. The state as the main regulator. The state needs to improve the quality of the urban environment and ensure the food security of megacities. At the same time, it seeks to minimize its business support costs (in case of vertical farms development of this new industry may require a substantial support from the state). In addition, the state may fear further depopulation of rural areas and decrease of income (and quality of life in general) of rural inhabitants associated with the transition to vertical farming within the city. This transition may cause destruction of traditional agricultural jobs. This depopulation poses threats to social stability and may require additional resources from the state to overcome its negative consequences.

Stakeholders can combine different roles. For example, Magnit is not only a retail company, but also the independent investor into the vertical farms creation (which corresponds to the policy of this company targeted to minimizing dependence on third-party suppliers). Similarly, iFarm (<https://ifarmproject.ru/projects>) not only owns farms, but also manages epy vertical farms of third-party owners.

As our analysis shows, the stakeholders not only share their common interests, but also have their contradictions. Therefore, the development of vertical farms will on a large scale depend on the balance of interests of the stakeholders. The state can play an important role in finding this balance by developing a favorable legislative framework and creating incentive measures to encourage investments into the vertical agriculture.

4. Conclusion

Vertical farms as an innovative form of organization agricultural production in the context of the transition to the digital economy have significant and promising potential:

1. First of all, they are a tool for the digital transformation of agriculture [66], which makes it possible to increase the efficiency of food production (by optimizing the usage of land resources, reducing logistics costs and widespread automation of production processes).

2. Due to vertical farms it is possible to improve the food supply of megacities (since food production is organized directly within the cities) and improve the quality of the urban environment.

3. Vertical farms serve as one of the tools for the transition to “smart city”, i. e. the digital transformation of cities [71].

The potential of vertical farms, in accordance with the practice of strategic analysis, can be presented in the form of a strategic matrix below (Table 2). To construct such a matrix, we use the following criteria:

1. Directions of influence of vertical farms — agriculture and cities.

2. The essence of the influence of digital farms — digital and non-digital elements.

Table 2. **Vertical farms potential strategic matrix**

Таблица 2. Стратегическая матрица потенциала вертикальных ферм

	Non-digital element	Digital element
Agricultural industry	Improving the efficiency of land use.	Tool for digital transformation of agriculture (based on a new model of organization of food production).
City	— Improving the supply of food to epy cities; — Improving the quality of the urban environment (recultivation of epy old industrial facilities, urban greening and accomplishment).	Transition to the concept of a “smart city” (by building a unified digital management system for the supply of food to cities).

This integrated approach to the very essence of vertical farms and their potential is proposed for the first time. This strategic matrix demonstrates key directions that should be taken into account in state and corporate strategies of development of vertical agriculture.

Important conditions for realizing this potential are:

1. Thorough economic evaluation of vertical farm projects (innovative technologies can be associated with high costs and risks).

2. Coordination of interests of stakeholders in the vertical agriculture industry in order to ensure their cooperation. This coordination is possible both on the basis of a partnership of stakeholders of different groups, and by combining the functions of different stakeholders by one market player (like in the case with Magnit, which simultaneously acts as a retail chain and an operator of vertical farms).

This paper makes an important contribution to the literature on vertical farms by describing the composition of vertical farms' ecosystem and defining the double nature of vertical farms as the tools that can increase efficiency of agricultural production and support transition to smart cities. These results can be used as a theoretical basis for multi-stakeholder

approach towards development of strategies of the vertical farms implementation.

The paper also demonstrates the key role of the state in the introduction of vertical farms. The tasks of the state include the following:

1. Finding a balance of interests of different groups of the stakeholders;
2. Creating a favorable environment for development of the vertical farms;
3. Using the vertical farms as one of the tools for the transition to "smart cities" as well as a mechanism to ensure urban food security;
4. Compensation and elimination of negative effects of the vertical farms (prevention of rural areas degradation, etc.).

REFERENCES

1. Armada, D., Guinée, J., Tukker, A. (2019). The second green revolution: Innovative urban agriculture's contribution to food security and sustainability — A review. *Global Food Security*, 22, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.08.002>
2. Soldatenkova, O.I. (2022). Modern agriculture in Canada. *USA and Canada: Economics, Politics, Culture*, 12, 86–100. <https://doi.org/10.31857/S2686673022120069> (In Russian)
3. Workie, E., Mackolil, J., Nyika, J., Ramadas, S. (2020). Deciphering the impact of COVID-19 pandemic on food security, agriculture, and livelihoods: A review of the evidence from developing countries. *Current Research in Environmental Sustainability*, 2, Article 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crsust.2020.100014>
4. Bakharev, V.V., Mityashin, G. Yu., Stepanova, T.V. (2023). Food security, food waste and food sharing: The conceptual analysis. *Food Systems*, 6(3), 390–396. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-3-390-396>
5. Plotnikov, V., Nikitin, Y., Maramygin, M., Ilyasov, R. (2021). National food security under institutional challenges (Russian experience). *International Journal of Sociology and Social Policy*, 41(1/2), 139–153. <https://doi.org/10.1108/IJSSP-03-2020-0074>
6. News item by Jamie Phillips for MailOnline: Which vegetables are being rationed in YOUR supermarket? Retrieved <https://www.dailymail.co.uk/news/article-11785341/Which-vegetables-rationed-supermarket-Retailers-limiting-sales-amid-UK-shortage.html>. Accessed March 8, 2023.
7. Gruvaeus, A., Dahlin, J. (2021). Revitalization of food in Sweden — A closer look at the REKO Network. *Sustainability*, 13(18), Article 10471. <https://doi.org/10.3390/su131810471>
8. Bakharev, V.V., Kapustina, I.V., Mityashin, G. Yu., Katrashova, Yu.V. (2020). Ecologization of retail: An analysis of strategies. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 12(5), 79–96. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2020-12-5-79-96> (In Russian)
9. Bakharev, V.V., Mityashin, G. Yu., Stelmashonok, E.V., Stelmashonok, V.L., Chargasiya, G.G. (2023). Trends of evolution of food security: Digital transformation, social entrepreneurship and human dignity. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 15(2), 363–391. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2023-15-2-363-391>
10. Ikramov, R. Mityashin, G. (2021). Ecologization of Retail: Russian Experience. E3S Web of Conferences, 284, Article 11018. <https://doi.org/10.1051/e3s-conf/202128411018>
11. Beacham, A.M., Vickers, L.H., Monaghan, J.M. (2019). Vertical farming: A summary of approaches to growing skywards. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(3), 277–283. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1574214>
12. Benke, K., Tomkins, B. (2017). Future food-production systems: Vertical farming and controlled-environment agriculture. *Sustainability: Science, Practice and Policy*, 13(1), 13–26. <https://doi.org/10.1080/15487733.2017.1394054>
13. Zhichkin, K.A., Nosov, V.V., Zhichkina L. N., Ramazanov, I.A., Kotyazhov, I.A., Abdulragimov, I.A. (2021). The food security concept as the state support basis for agriculture. *Agronomy Research*, 19(2), 629–637. <https://doi.org/10.1515/AR.21.097>
14. Amirova, E.F., Gavril'yeva, N.K., Romanishina, T.S., Asfandiarova, R.A. (2022). On the problem of the development of «sustainable» agriculture in modern economic realities. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(3), 392–406. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-3-392-406>
15. Tatarintsev, V.L., Shostak, M.M., Tatarintsev, L.M. (2022). Organizing sustainable agricultural land management in Altai krai: A geo-ecological prospect. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(2), 356–372. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-2-356-372>
16. Tingayev, A.V., Cheprunova, Yu.V. (2022). Impact of pollutants in the soil of the agrolandscape of the recultivated landfill on crops. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(2), 373–386. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-2-373-386>
17. Mirzabaev, A., von Braun, J. (2022). True cost of food and land degradation. *Russian Journal of Economics*, 8(1), 7–15. <https://doi.org/10.32609/r.jue.8.78376>
18. Turck, A., Schloemer, L., Terlau, W. (2023). Farmers are caught in Tri-Dilemma — objectives and challenges for biodiversity in German nature-protected areas. *International Journal of Food System Dynamics*, 14(2), 237–250. <https://doi.org/10.18461/ijfsd.v14i2.F8>
19. Doll, R. (2022). Agricultural modernisation and diabolic landscapes of dispossession in rural China. *Antipode*, 54(6), 1738–1759. <https://doi.org/10.1111/anti.12857>
20. Magnan, A., Davidson, M., Desmarais, A. A. (2023). 'They call it progress, but we don't see it as progress': Farm consolidation and land concentration in Saskatchewan, Canada. *Agriculture and Human Values*, 40, 277–290. <https://doi.org/10.1007/s10460-022-10353-y>
21. Yi, F., Gudaj, R.T., Arefieva, V., Yanbykh, R., Mishchuk, S., Potenko, T.A. et al. (2020). Chinese migrant farmers in the Russian Far East: Impact on rural labor markets. *American Journal of Economics and Sociology*, 79(5), 1455–1482. <https://doi.org/10.1111/ajes.12363>
22. Kotliarov, I.D. (2022). Heterogeneity of stakeholders as an obstacle to the development of cooperatives in Russia. *The Russian Peasant Studies*, 7(4), 20–32. <https://doi.org/10.22394/2500-1809-2022-7-4-20-32>
23. Korotkikh, A. (2022). Transforming us agriculture: Perspective directions for development. *Russia and America in the 21st Century*, 6, Article 14. <https://doi.org/10.18254/S207054760023474-8> (In Russian)
24. Singh, G., Kalra, N., Yadav, N., Sharma, A., Saini, M. (2022). Smart agriculture: A review. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(6), 423–454. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-6-423-454>
25. Lytos, A., Lagkas, T., Sarigiannidis, P., Zervakis, M., Livanos, G. (2020). Towards smart farming: Systems, frameworks and exploitation of multiple sources. *Computer Networks*, 172, Article 107147. <https://doi.org/10.1016/j.comnet.2020.107147>
26. Kuznetsova, K.G., Sitnov, V. Yu., Ryabukhin, D.S. (2023). Prospects for including edible insects into the food composition. *Food Systems*, 6(3), 397–402. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-3-397-402> (In Russian)
27. Gorbunova N. A., Zakharov A. N. (2021). Edible insects as a source of alternative protein. A review. *Theory and Practice of Meat Processing*, 6(1), 23–32. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2021-6-1-23-32>
28. Lewisch, L., Riefler, P. (2023). Cultured meat acceptance for global food security: A systematic literature review and future research directions. *Agricultural and Food Economics*, 11, Article 48. <https://doi.org/10.1186/s40100-023-00287-2>
29. Ong, K.J., Johnston, J., Datar, I., Sewalt, V., Holmes, D., Shatkin, J. A. (2021). Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5421–5448. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12853>
30. Soice, E., Johnston, J. (2021). How cellular agriculture systems can promote food security. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, Article 753996. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.753996>
31. Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A., Sexton A. (2018). Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.010>
32. Tuffour, M. (2022). Sustaining urban agriculture under intense urbanization in Ghana: Emerging and existing roles of formal institutions. *Theoretical and Empirical Researches in Urban Management*, 17(3), 54–70.
33. La Trobe, H. L., Acott, T. G. (2000). Localising the global food system. *International Journal of Sustainable Development and World Ecology*, 7(4), 309–320. <https://doi.org/10.1080/13504500009470050>
34. Ochoa, Y., Ruiz M., Olmo, M., Figueroa, M., Rodríguez, T. (2020). Peri-Urban Organic agriculture and short food supply chains as drivers for strengthening city/region food systems — Two case studies in Andalucía, Spain. *Land*, 9(6), Article 177. <https://doi.org/10.3390/land9060177>
35. Snikersproge, I. (2023). Who are neorurals? or, how capitalist time discipline dilutes political projects and makes it difficult to propose an alternative. *Economic Anthropology*, 10(1), 65–76. <https://doi.org/10.1002/sea2.12258>
36. Campbell, C., DeLong, A., Diaz, J. (2023). Commercial urban agriculture in Florida: A qualitative needs assessment. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 38, Article e4. <https://doi.org/10.1017/S1742170522000370>
37. Gustavsen, G.W., Berglann, H.B., Jenssen, E., Kärstad, S., Rodriguez, D.G.P. (2022). The value of urban farming in Oslo, Norway: Community gardens, aquaponics and vertical farming. *International Journal on Food Systems Dynamics*, 13(1), 17–29. <https://doi.org/10.18461/ijfsd.v13i1.A2>
38. Pfeiffer, A., Silva, E., Colquhoun, J. (2015). Innovation in urban agricultural practices: Responding to diverse production environments. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 30(1), 79–91. <https://doi.org/10.1017/S1742170513000537>
39. Ayoni, V.D.N., Ramlı, N.N., Shamsudin, M.N., Hadi, A.H.I.A. (2023). Non-growers' perspectives on home gardening: Exploring for future attraction. *Journal of Regional and City Planning*, 34(1), 16–34. <https://doi.org/10.5614/jpwk.2023.34.1.2>
40. Cardona, E., Markwick, R. (2019). The kitchen garden movement on the Soviet home front, 1941–1945. *Journal of Historical Geography*, 64, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jhg.2018.12.006>
41. Eng, S., Khun, T., Jower, S., Murro, M.J. (2019). Healthy lifestyle through home gardening: The art of sharing. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 13(4), 347–350. <https://doi.org/10.1177/1559827619842068>
42. Kirkpatrick, J., Davison, A. (2018). Home-grown: Gardens, practices and motivations in urban domestic vegetable production. *Landscape and Urban Planning*, 170, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2017.09.023>
43. Doyle, G. (2022). In the garden: Capacities that contribute to community groups establishing community gardens. *International Journal of Urban Sustainable Development*, 14(1), 15–32. <https://doi.org/10.1080/19463158.2022.2045997>
44. Joshi, N., Wende, W. (2022). Physically apart but socially connected: Lessons in social resilience from community gardening during the COVID-19 pandemic.

- Landscape and Urban Planning*, 223(3), Article 104418. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2022.104418>
45. Moghayed, A., Richter, I., Owoade, F., Kapanji-Kakoma, K., Kaliyadasa, E., Francis, S. et al. (2022). Effects of urban smart farming on local economy and food production in urban areas in African cities. *Sustainability*, 14(17), Article 10836. <https://doi.org/10.3390/su141710836>
 46. Then, E.-W., Hong, M. (2022). Urban agriculture: The feasibility of rooftop farming in Penang Island, Malaysia. *Journal of Urban and City Planning*, 33(1), 111–125. <https://doi.org/10.5614/jpwk.2022.33.1.6>
 47. Ikejima, Y. (2015). *The Reality of Food Deserts in a Large Japanese City and Their Resolution Using Urban Agriculture*. Food Security and Food Safety for the Twenty-first Century. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-287-417-7_18
 48. Martin, W., Pham, A., Wagner, L., Werner, A. (2022). Social value of a Canadian urban food bank garden. *Journal of Agriculture, Food Systems, and Community Development*, 11(4), 197–222. <https://doi.org/10.5304/jafscd.2022.114.013>
 49. Masvaura, S. (2016). Coping with food poverty in cities: The case of urban agriculture in Glen Norah Township in Harare. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 31(3), 202–213. <https://doi.org/10.1017/S1742170515000101>
 50. Paul, B. (2022). Urban agricultural activities, a food system resilience strategy during COVID-19 in Haiti. *Food Systems*, 5(4), 327–336. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-327-336>
 51. Hasson, A. (2019). Building London's food democracy: Assessing the contributions of urban agriculture to local food decision-making. *Politics and Management*, 7(4), 154–164. <https://doi.org/10.17645/pag.v7i4.2079>
 52. Leech, B., Strunk, C. (2021). Making locals through local agriculture: Citizenship and urban gardens in Rock Island, Illinois, 1913–2018. *Food, Culture and Society*, 24(5), 639–662. <https://doi.org/10.1080/15528014.2021.1884412>
 53. Al-Chalabi, M. (2015). Vertical farming: Skyscraper sustainability? *Sustainable Cities and Society*, 18, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.scs.2015.06.003>
 54. Al-Kodmany, K. (2018). The vertical farm: A review of developments and implications for the vertical city. *Buildings*, 8(2), Article 24. <https://doi.org/10.3390/buildings8020024>
 55. Al-Kodmany, K. (2020). The vertical farm: Exploring applications for peri-urban areas. Chapter in a book: *Smart Village Technology*, vol 17. Springer, Cham, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37794-6_11
 56. Butturini, M., Marcelis, L. (2020). Vertical farming in Europe: Present status and outlook. Chapter in a book: *Plant Factory*. Academic Press, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00004-2>
 57. Marks, P. (2014). Vertical farming growing up in a big way. *New Scientist*, 221(2952), 17–18. [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(14\)60124-X](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(14)60124-X)
 58. Khan, R.R.A., Ahmed, V. (2017). Building information modelling and vertical farming: Data integration to manage facilities and processes. *Facilities*, 35(13/14), 710–724. <https://doi.org/10.1108/F-03-2016-0026>
 59. Besten, J. (2019). Vertical Farming Development; the Dutch Approach. Chapter in a book: *Plant Factory Using Artificial Light*. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813973-8.00027-0>
 60. Despommier, D. (2014). Vertical farms in horticulture. Chapter in a book: *Encyclopedia of Food and Agricultural Ethics*. Springer, Dordrecht, 2014. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6167-4_88-3
 61. Tuomisto, H.L. (2019). Vertical farming and cultured meat: Immature technologies for urgent problems. *One Earth*, 1(3), 275–277. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.024>
 62. Teo, Y.L., Go, Y.I. (2021). Techno-economic-environmental analysis of solar/hybrid/storage for vertical farming system: A case study, Malaysia. *Renewable Energy Focus*, 37, 50–67. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2021.02.005>
 63. Despommier, D. (2013). Farming up the city: The rise of urban vertical farms. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 388–389. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.008>
 64. Waller, L., Gugganig, M. (2021). Re-visioning public engagement with emerging technology: A digital methods experiment on 'vertical farming'. *Public Understanding of Science*, 30(5), 588–604. <https://doi.org/10.1177/0963666251990977>
 65. de Oliveira, F.B., Forbes, H., Schaefer, D., Syed, J.M. (2020). Lean principles in vertical farming: A case study. *Procedia CIRP*, 93, 712–717. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2020.03.017>
 66. Kumar, M.S., Heuvelink, E., Marcelis, L.F.M. (2020). Vertical farming: Moving from genetic to environmental modification. *Trends in Plant Science*, 25(8), 724–727. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.012>
 67. Stein, E.W. (2021). The transformative environmental effects large-scale indoor farming may have on air, water, and soil. *Air, Soil and Water Research*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1177/1178622121995819>
 68. Stelmashonok, E.V., Stelmashonok, V.L. (2021). Digital transformation of the agro-industrial complex: An analysis of prospects. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 13(2), 336–365. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2021-13-2-336-365> (In Russian)
 69. Deloitte Transformation from Agriculture to AgTech 2016. Retrieved from <https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/de/Documents/consumer-industrial-products/Deloitte-Transformation-from-Agriculture-to-AgTech-2016.pdf>. Accessed October 8, 2021.
 70. Batmetan, J.R., Kainde, Q.C. (2022). Understanding smart city strategy in developing countries' cities. *Theoretical and Empirical Researches in Urban Management*, 17(3), 71–88.
 71. Maye, D. (2019). «Smart food city»: Conceptual relations between smart city planning, urban food systems and innovation theory. *City, Culture and Society*, 16, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccs.2017.12.001>
 72. Meijer, A., Bolívar, M.P.R. (2016). Governing the smart city: A review of the literature on smart urban management. *International Review of Administrative Sciences*, 82(2), 392–408. <https://doi.org/10.1177/0020852314564308>
 73. Moore, J.F. (2006). Business ecosystems and the view from the firm. *The Antitrust Bulletin*, 51(1), 31–75. <https://doi.org/10.1177/0003603X0605100103>
 74. Hein, A., Schrieck, M., Riasanow, T., Setzke, D.S., Wiesche, M., Böhm, M. et al. (2020). Digital platform ecosystems. *Electronic Markets*, 30, 87–98. <https://doi.org/10.1007/s12525-019-00377-4>
 75. Lee, I., Shin, Y.J. (2018). Fintech: Ecosystem, business models, investment decisions, and challenges. *Business Horizons*, 61(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.bushor.2017.09.003>
 76. Spithoven, A. (2019). Theory and reality of cryptocurrency management. *Journal of Economic Issues*, 53(2), 385–393. <https://doi.org/10.1080/00213624.2019.1594518>
 77. Sutriadi, R., Aziz, F.N., Ramadhan, A. (2022). Communicative city features in technopole development: A case study in Bandung, Indonesia. *Journal of Regional and City Planning*, 33(1), 84–115. <https://doi.org/10.5614/jpwk.2022.33.1.5>
 78. Jacobides, M. G., Cennamo, C., Gawer, A. (2018). Towards a theory of ecosystems. *Strategic Management Journal*, 39(8), 2255–2276. <https://doi.org/10.1002/smj.2904>
 79. Kotliarov, I. (2021). Monetization management in restaurant business. *Food Processing: Techniques and Technology*, 51(1), 146–158. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-146-158> (In Russian)
 80. Fedotova, G.V., Vertakova, Yu.V., Klevtsova, M.G. (2021). The impact of climate change on regional food security. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 848(1), Article 012189. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/848/1/012189>
 81. Blom, C.D.B., Steegeman, P., Voss C., Sonneveld, B.G.J.S. (2022). Food in the cold: Exploring food security and sovereignty in Whitehorse, Yukon. *International Journal of Circumpolar Health*, 81(1), Article 2025992. <https://doi.org/10.1080/2423982.2022.2025992>
 82. Wegren, S. K. (2018). The insecurity of food security in Russia's Far North. *Polar Geography*, 41(4), 294–313. <https://doi.org/10.1080/1088937X.2018.1522383>
 83. Januszkiewicz, K., Jarmusz, M. (2017). Envisioning urban farming for food security during the climate change era. Vertical farm within highly urbanized areas. *IOP Conference Series: Material Science and Engineering*, 245, Article 052094. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/245/5/052094>
 84. Zhilyakov, D.I., Vertakova, Yu.V., Kharchenko, E.V. (2020). Trends and prospects for the development of horticulture and vegetable growing in the region. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 548(8), Article 082039. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/548/8/082039>
 85. Vaughan, A. (2019). Is vertical farming the way to a greener life? *New Scientist*, 242(3235), 15. [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(19\)31112-1](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(19)31112-1)
 86. Namazov, A.K., Kushelev, S.A., Guzikova, L.A., Namazov, K.A. (2020). Ecological economy in the context of ecological policy. *E3S Web of Conferences*, 161, Article 01003. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202016101003>
 87. Kóna, A., Horváth, P., Brix, R. (2022). Slovakia on the way to the SMART future, the last opportunity for municipalities. *Administration and Public Management Review*, 58, 180–196. <https://doi.org/10.24818/amp/2022.38-11>
 88. Doguchayeva, S., Zubkova, S., Katrashova, Yu. (2022). Blockchain in public supply chain management: Advantages and risks. *Transportation Research Procedia*, 63, 2172–2178. <https://doi.org/10.1016/j.trpro.2022.06.244>
 89. Langendahl, P.-A. (2021). The politics of smart farming expectations in urban environments. *Frontiers in Sustainable Cities*, 3, Article 691951. <https://doi.org/10.3389/frsc.2021.691951>
 90. Garewal, K. (2020). The Cryptocurrency Ecosystem. Chapter in a book: *Practical Blockchains and Cryptocurrencies*. Apress, Berkeley, CA, 2020. https://doi.org/10.1007/978-1-4842-5893-4_2

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Armada, D., Guinée, J., Tukker, A. (2019). The second green revolution: Innovative urban agriculture's contribution to food security and sustainability — A review. *Global Food Security*, 22, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.08.002>
2. Солдатенкова, О. И. (2022). Сельское хозяйство Канады на современном этапе. *США и Канада: экономика, политика, культура*, 12, 86–100. <https://doi.org/10.31857/S2686673022120069>
3. Workie, E., Mackolil, J., Nyika, J., Ramadas, S. (2020). Deciphering the impact of COVID-19 pandemic on food security, agriculture, and livelihoods: A review of the evidence from developing countries. *Current Research in Environmental Sustainability*, 2, Article 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crsust.2020.100014>
4. Bakharev, V.V., Mityashin, G. Yu., Stepanova, T.V. (2023). Food security, food waste and food sharing: The conceptual analysis. *Food Systems*, 6(3), 390–396. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-3-390-396>
5. Plotnikov, V., Nikitin, Y., Maramygin, M., Ilyasov, R. (2021). National food security under institutional challenges (Russian experience). *International Journal of Sociology and Social Policy*, 41(1/2), 139–153. <https://doi.org/10.1108/IJSSP-03-2020-0074>
6. News item by Jamie Phillips for MailOnline: Which vegetables are being rationed in YOUR supermarket? Retrieved <https://www.dailymail.co.uk/news/article-11785341/Which-vegetables-rationed-supermarket-Retailers-limiting-sales-amid-UK-shortage.html>. Accessed March 8, 2023.
7. Gruvaev, A., Dahlin, J. (2021). Revitalization of food in Sweden — A closer look at the REKO Network. *Sustainability*, 13(18), Article 10471. <https://doi.org/10.3390/su131810471>
8. Бахареv, В.В., Капустина, И.В., Митяшин, Г.Ю., Катрашова, Ю.В. (2020). Экологизация розничной торговли: анализ стратегий. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 12(5), 79–96. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2020-12-5-79-96>
9. Bakharev, V.V., Mityashin, G. Yu., Stelmashonok, E.V., Stelmashonok, V.L., Chargas-iy, G.G. (2023). Trends of evolution of food security: Digital transformation, social entrepreneurship and human dignity. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 15(2), 363–391. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2023-15-2-363-391>
10. Ikramov, R. Mityashin, G. (2021). Ecologization of Retail: Russian Experience. *E3S Web of Conferences*, 284, Article 11018. <https://doi.org/10.1051/e3s-conf/202128411018>
11. Beacham, A.M., Vickers, L.H., Monaghan, J.M. (2019). Vertical farming: A summary of approaches to growing skywards. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(3), 277–283. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1574214>

12. Benke, K., Tomkins, B. (2017). Future food-production systems: Vertical farming and controlled-environment agriculture. *Sustainability: Science, Practice and Policy*, 13(1), 13–26. <https://doi.org/10.1080/15487733.2017.1394054>
13. Zhichkin, K.A., Nosov, V.V., Zhichkina L. N., Ramazanov, I.A., Kotyazhov, I.A., Abdulragimov, I.A. (2021). The food security concept as the state support basis for agriculture. *Agronomy Research*, 19(2), 629–637. <https://doi.org/10.1515/AR.21.097>
14. Amirova, E.F., Gavril'yeva, N.K., Romanishina, T.S., Asfandiarova, R.A. (2022). On the problem of the development of «sustainable» agriculture in modern economic realities. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(3), 392–406. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-3-392-406>
15. Tatarintsev, V.L., Shostak, M.M., Tatarintsev, L.M. (2022). Organizing sustainable agricultural land management in Altai krai: A geo-ecological prospect. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(2), 356–372. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-2-356-372>
16. Tingayev, A.V., Cheprunova, Yu.V. (2022). Impact of pollutants in the soil of the agrolandscape of the recultivated landfill on crops. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(2), 373–386. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-2-373-386>
17. Mirzabaei, A., von Braun, J. (2022). True cost of food and land degradation. *Russian Journal of Economics*, 8(1), 7–15. <https://doi.org/10.32609/rje.8.78376>
18. Turck, A., Schloemer, L., Terlau, W. (2023). Farmers are caught in Tri-Dilemma – objectives and challenges for biodiversity in German nature-protected areas. *International Journal of Food System Dynamics*, 14(2), 237–250. <https://doi.org/10.18461/ijfsd.v14i2.F8>
19. Doll, R. (2022). Agricultural modernisation and diabolic landscapes of dispossession in rural China. *Antipode*, 54(6), 1738–1759. <https://doi.org/10.1111/anti.12857>
20. Magnan, A., Davidson, M., Desmarais, A. A. (2023). ‘They call it progress, but we don’t see it as progress’: Farm consolidation and land concentration in Saskatchewan, Canada. *Agriculture and Human Values*, 40, 277–290. <https://doi.org/10.1007/s10460-022-10353-y>
21. Yi, F., Gudaj, R.T., Arefieva, V., Yanbykh, R., Mishchuk, S., Potenko, T.A. et al. (2020). Chinese migrant farmers in the Russian Far East: Impact on rural labor markets. *American Journal of Economics and Sociology*, 79(5), 1455–1482. <https://doi.org/10.1111/ajes.12363>
22. Kotliarov, I.D. (2022). Heterogeneity of stakeholders as an obstacle to the development of cooperatives in Russia. *The Russian Peasant Studies*, 7(4), 20–32. <https://doi.org/10.22394/2500-1809-2022-7-4-20-32>
23. Коротких, А.А. (2022). Трансформация сельского хозяйства США: перспективные направления развития. *Россия и Америка в XXI веке*, 6, Статья 14. <https://doi.org/10.18254/S207054760023474-8>
24. Singh, G., Kalra, N., Yadav, N., Sharma, A., Saini, M. (2022). Smart agriculture: A review. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 14(6), 423–454. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2022-14-6-423-454>
25. Lytos, A., Lagkas, T., Sarigiannidis, P., Zervakis, M., Livanos, G. (2020). Towards smart farming: Systems, frameworks and exploitation of multiple sources. *Computer Networks*, 172, 107147. <https://doi.org/10.1016/j.comnet.2020.107147>
26. Кузнецова, К.Г., Ситнов, В.Ю., Рыбухин, Д.С. (2023). Перспективы включения съедобных насекомых в состав продуктов питания. *Пищевые системы*, 6(3), 397–402. DOI 10.21523/2618-9771-2023-6-3-397-402
27. Gorbunova N. A., Zakharov A. N. (2021). Edible insects as a source of alternative protein. A review. *Theory and Practice of Meat Processing*, 6(1), 23–32. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2021-6-1-23-32>
28. Lewisch, L., Riefler, P. (2023) Cultured meat acceptance for global food security: A systematic literature review and future research directions. *Agricultural and Food Economics*, 11, Article 48. <https://doi.org/10.1186/s40100-023-00287-2>
29. Ong, K.J., Johnston, J., Datar, I., Sewalt, V., Holmes, D., Shatkin, J. A. (2021). Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5421–5448. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12853>
30. Soice, E., Johnston, J. (2021). How Cellular Agriculture Systems Can Promote Food Security. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, Article 753996. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.753996>
31. Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A., Sexton A. (2018). Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.010>
32. Tuffour, M. (2022). Sustaining urban agriculture under intense urbanization in Ghana: Emerging and existing roles of formal institutions. *Theoretical and Empirical Researches in Urban Management*, 17(3), 54–70.
33. La Trobe, H. L., Acott, T. G. (2000). Localising the global food system. *International Journal of Sustainable Development ND World Ecology*, 7(4), 309–320. <https://doi.org/10.1080/13504500009470050>
34. Ochoa, Y., Ruiz M., Olmo, M., Figueroa, M., Rodríguez, T. (2020). Peri-urban organic agriculture and short food supply chains as drivers for strengthening city/region food systems – Two case studies in Andalucía, Spain. *Land*, 9(6), Article 177. <https://doi.org/10.3390/land9060177>
35. Snikersproge, I. (2023). Who are neorurals? or, How capitalist time discipline dilutes political projects and makes it difficult to propose an alternative. *Economic Anthropology*, 10(1), 65–76. <https://doi.org/10.1002/sea2.12258>
36. Campbell, C., DeLong, A., Diaz, J. (2023). Commercial urban agriculture in Florida: A qualitative needs assessment. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 38, Article e4. <https://doi.org/10.1017/S1742170522000370>
37. Gustavsen, G.W., Berglann, H.B., Jenssen, E., Kårstad, S., Rodriguez, D.G.P. (2022). The value of urban farming in Oslo, Norway: Community gardens, aquaponics and vertical farming. *International Journal on Food Systems Dynamics*, 13(1), 17–29. <https://doi.org/10.18461/ijfsd.v13i1.A2>
38. Pfeiffer, A., Silva, E., Colquhoun, J. (2015). Innovation in urban agricultural practices: Responding to diverse production environments. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 30(1), 79–91. <https://doi.org/10.1017/S1742170513000537>
39. Ayoni, V.D.N., Ramli, N.N., Shamsudin, M.N., Hadi, A.H.I.A. (2023). Non-growers’ perspectives on home gardening: Exploring for future attraction. *Journal of Regional and City Planning*, 34(1), 16–34. <https://doi.org/10.5614/jpwk.2023.34.1.2>
40. Cardona, E., Markwick, R. (2019). The kitchen garden movement on the Soviet home front, 1941–1945. *Journal of Historical Geography*, 64, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jhg.2018.12.006>
41. Eng, S., Khun, T., Jower, S., Murro, M.J. (2019). Healthy Lifestyle Through Home Gardening: The Art of Sharing. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 13(4), 347–350. <https://doi.org/10.1177/1559827619842068>
42. Kirkpatrick, J., Davison, A. (2018). Home-grown: Gardens, practices and motivations in urban domestic vegetable production. *Landscape and Urban Planning*, 170, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2017.09.023>
43. Doyle, G. (2022). In the garden: Capacities that contribute to community groups establishing community gardens. *International Journal of Urban Sustainable Development*, 14(1), 15–32. <https://doi.org/10.1080/19463138.2022.2045997>
44. Joshi, N., Wende, W. (2022). Physically apart but socially connected: Lessons in social resilience from community gardening during the COVID-19 pandemic. *Landscape and Urban Planning*, 223(3), Article 104418. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2022.104418>
45. Moghayedil, A., Richter, I., Owoade, F., Kapanji-Kakoma, K., Kaliyadasa, E., Francis, S. et al. (2022). Effects of urban smart farming on local economy and food production in urban areas in African cities. *Sustainability*, 14(17), Article 10836. <https://doi.org/10.3390/su141710836>
46. Then, E.-W., Hong, M. (2022). Urban agriculture: The feasibility of rooftop farming in Penang Island, Malaysia. *Journal of Urban and City Planning*, 33(1), 111–125. <https://doi.org/10.5614/jpwk.2022.33.1.6>
47. Ikejima, Y. (2015). *The Reality of Food Deserts in a Large Japanese City and Their Resolution Using Urban Agriculture*. Food Security and Food Safety for the Twenty-first Century. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-287-417-7_18
48. Martin, W., Pham, A., Wagner, L., Werner, A. (2022). Social value of a Canadian urban food bank garden. *Journal of Agriculture, Food Systems, and Community Development*, 11(4), 197–222. <https://doi.org/10.5304/jafscd.2022.114.013>
49. Masvaure, S. (2016). Coping with food poverty in cities: The case of urban agriculture in Glen Norah Township in Harare. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 31(3), 202–213. <https://doi.org/10.1017/S1742170515000101>
50. Paul, B. (2022). Urban agricultural activities, a food system resilience strategy during COVID-19 in Haiti. *Food Systems*, 5(4), 327–336. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-327-336>
51. Hasson, A. (2019). Building London’s food democracy: Assessing the contributions of urban agriculture to local food decision-making. *Politics and Management*, 7(4), 154–164. <https://doi.org/10.17645/pag.v7i4.2079>
52. Leech, B., Strunk, C. (2021). Making locals through local agriculture: Citizenship and urban gardens in Rock Island, Illinois, 1913–2018. *Food, Culture and Society*, 24(5), 639–662. <https://doi.org/10.1080/15528014.2021.1884412>
53. Al-Chalabi, M. (2015). Vertical farming: Skyscraper sustainability? *Sustainable Cities and Society*, 18, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.scs.2015.06.003>
54. Al-Kodmany, K. (2018). The vertical farm: A review of developments and implications for the vertical city. *Buildings*, 8(2), Article 24. <https://doi.org/10.3390/buildings8020024>
55. Al-Kodmany, K. (2020). The vertical farm: Exploring applications for peri-urban areas. Chapter in a book: *Smart Village Technology*, vol 17. Springer, Cham, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37794-6_11
56. Butturini, M., Marcelis, L. (2020). Vertical farming in Europe: Present status and outlook. Chapter in a book: *Plant Factory*. Academic Press, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00004-2>
57. Marks, P. (2014). Vertical farming growing up in a big way. *New Scientist*, 221(2952), 17–18. [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(14\)60124-X](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(14)60124-X)
58. Khan, R.R.A., Ahmed, V. (2017). Building information modelling and vertical farming: Data integration to manage facilities and processes. *Facilities*, 35(13/14), 710–724. <https://doi.org/10.1108/F-03-2016-0026>
59. Besten, J. (2019). Vertical Farming Development; the Dutch Approach. Chapter in a book: *Plant Factory Using Artificial Light*. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813973-8.00027-0>
60. Despommier, D. (2014). Vertical farms in horticulture. Chapter in a book: *Encyclopedia of Food and Agricultural Ethics*. Springer, Dordrecht, 2014. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6167-4_88-3
61. Tuomisto, H.L. (2019). Vertical farming and cultured meat: Immature technologies for urgent problems. *One Earth*, 1(3), 275–277. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.024>
62. Teo, Y.L., Go, Y.I. (2021). Techno-economic-environmental analysis of solar/hybrid/storage for vertical farming system: A case study, Malaysia. *Renewable Energy Focus*, 37, 50–67. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2021.02.005>
63. Despommier, D. (2013). Farming up the city: The rise of urban vertical farms. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 388–389. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.008>
64. Waller, L., Gugganig, M. (2021). Re-visioning public engagement with emerging technology: A digital methods experiment on ‘vertical farming’. *Public Understanding of Science*, 30(5), 588–604. <https://doi.org/10.1177/09636662521990977>
65. de Oliveira, F.B., Forbes, H., Schaefer, D., Syed, J.M. (2020). Lean principles in vertical farming: A case study. *Procedia CIRP*, 93, 712–717. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2020.03.017>
66. Kumar, M.S., Heuvelink, E., Marcelis, L.F.M. (2020). Vertical farming: Moving from genetic to environmental modification. *Trends in Plant Science*, 25(8), 724–727. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.012>
67. Stein, E.W. (2021). The transformative environmental effects large-scale indoor farming may have on air, water, and soil. *Air, Soil and Water Research*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1177/1178622121995819>
68. Stelmashonok, E., Stelmashonok, V. (2021). Цифровая трансформация агропромышленного комплекса: анализ перспектив. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 13(2), 336–365. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2021-13-2-336-365>

69. Deloitte Transformation from Agriculture to AgTech 2016. Retrieved from <https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/de/Documents/consumer-industrial-products/Deloitte-Transformation-from-Agriculture-to-AgTech-2016.pdf>. Accessed October 8, 2021.
70. Batmetan, J.R., Kaide, Q.C. (2022). Understanding smart city strategy in developing countries' cities. *Theoretical and Empirical Researches in Urban Management*, 17(3), 71–88.
71. Maye, D. (2019). «Smart food city»: Conceptual relations between smart city planning, urban food systems and innovation theory. *City, Culture and Society*, 16, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccs.2017.12.001>
72. Meijer, A., Bolivar, M.P.R. (2016). Governing the smart city: A review of the literature on smart urban management. *International Review of Administrative Sciences*, 82(2), 392–408. <https://doi.org/10.1177/0020852314564308>
73. Moore, J.F. (2006). Business ecosystems and the view from the firm. *The Antitrust Bulletin*, 51(1), 31–75. <https://doi.org/10.1177/0003603X0605100103>
74. Hein, A., Schrieck, M., Riasanow, T., Setzke, D.S., Wiesche, M., Böhm, M. et al. (2020). Digital platform ecosystems. *Electronic Markets*, 30, 87–98. <https://doi.org/10.1007/s12525-019-00377-4>
75. Lee, I., Shin, Y. J. (2018). Fintech: Ecosystem, business models, investment decisions, and challenges. *Business Horizons*, 61(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.bushor.2017.09.003>
76. Spithoven, A. (2019). Theory and reality of cryptocurrency management. *Journal of Economic Issues*, 53(2), 385–393. <https://doi.org/10.1080/00213624.2019.1594518>
77. Sutriadi, R., Aziz, F.N., Ramadhan, A. (2022). Communicative city features in technopole development: A case study in Bandung, Indonesia. *Journal of Regional and City Planning*, 33(1), 84–115. <https://doi.org/10.5614/jpwk.2022.33.1.5>
78. Jacobides, M. G., Cennamo, C., Gawer, A. (2018). Towards a theory of ecosystems. *Strategic Management Journal*, 39(8), 2255–2276. <https://doi.org/10.1002/smj.2904>
79. Котляров, И. Д. (2021). Управление монетизацией в ресторанном бизнесе. *Техника и технология пищевых производств*, 51(1), 146–158. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-146-158>
80. Fedotova, G.V., Vertakova, Yu.V., Klevtsova, M.G. (2021). The impact of climate change on regional food security. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 848(1), Article 012189. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/848/1/012189>
81. Blom, C.D.B., Steegeman, P., Voss C., Sonneveld, B.G.J.S. (2022). Food in the cold: Exploring food security and sovereignty in Whitehorse, Yukon. *International Journal of Circumpolar Health*, 81(1), Article 2025992. <https://doi.org/10.1080/2423982.2022.2025992>
82. Wegren, S. K. (2018). The insecurity of food security in Russia's Far North. *Polar Geography*, 41(4), 294–313. <https://doi.org/10.1080/1088937X.2018.1522383>
83. Januszkiewicz, K., Jarmusz, M. (2017). Envisioning urban farming for food security during the climate change era. *Vertical farm within highly urbanized areas. IOP Conference Series: Material Science and Engineering*, 245, Article 052094. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/245/5/052094>
84. Zhilyakov, D.I., Vertakova, Yu.V., Kharchenko, E.V. (2020). Trends and prospects for the development of horticulture and vegetable growing in the region. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 548(8), Article 082039. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/548/8/082039>
85. Vaughan, A. (2019). Is vertical farming the way to a greener life? *New Scientist*, 242(3235), 15. [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(19\)31112-1](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(19)31112-1)
86. Namazov, A.K., Kushelev, S.A., Guzikova, L.A., Namazov, K.A. (2020). Ecological economy in the context of ecological policy. *E3S Web of Conferences*, 161, Article 01003. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202016101003>
87. Kóna, A., Horváth, P., Brix, R. (2022). Slovakia on the way to the SMART future, the last opportunity for municipalities. *Administration and Public Management Review*, 38, 180–196. <https://doi.org/10.24818/amp/2022.38-11>
88. Dogucheva, S., Zubkova, S., Katrashova, Yu. (2022). Blockchain in public supply chain management: Advantages and risks. *Transportation Research Procedia*, 63, 2172–2178. <https://doi.org/10.1016/j.trpro.2022.06.244>
89. Langendahl, P.-A. (2021). The politics of smart farming expectations in urban environments. *Frontiers in Sustainable Cities*, 3, Article 691951. <https://doi.org/10.3389/frsc.2021.691951>
90. Garewal, K. (2020). The Cryptocurrency Ecosystem. Chapter in a book: *Practical Blockchains and Cryptocurrencies*. Apress, Berkeley, CA, 2020. https://doi.org/10.1007/978-1-4842-5893-4_2

AUTHOR INFORMATION		СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	
Affiliation		Принадлежность к организации	
Yuliya A. Dovganeva , Assistant, Graduate School of Service and Trade, Institute of Industrial Management, Economics and Trade, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University 50, Novorossiyskaya str., 50, Saint-Petersburg, 194021, Russia Tel.: +7-953-348-77-51 E-mail: dovganeva_yua@spbstu.ru ORCID: https://orcid.org/0009-0000-0819-2770		Довганёва Юлия Александровна — ассистент, Высшая школа сервиса и торговли, Институт промышленного менеджмента, экономики и торговли, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого 194021, Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, 50 Тел.: +7-953-348-77-51 E-mail: dovganeva_yua@spbstu.ru ORCID: https://orcid.org/0009-0000-0819-2770	
Yuliya V. Katrashova , Bachelor of «Public administration» direction, Graduate School of Administrative Management, Institute of Industrial Management, Economics and Trade, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University 50, Novorossiyskaya str., 50, Saint-Petersburg, 194021, Russia Tel.: +7-999-537-30-58 E-mail: ul.katrashova@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9504-6620 * corresponding author		Катрашова Юлия Валентиновна — бакалавр направления «Государственное и муниципальное управление», Высшая школа административного управления, Институт промышленного менеджмента, экономики и торговли, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого 194021, Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, 50 Тел.: +7-999-537-30-58 E-mail: ul.katrashova@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9504-6620 * автор для контактов	
Tatyana V. Kirillova , Candidate of Economic Sciences, Docent, Graduate School of Service and Trade, Institute of Industrial Management, Economics and Trade, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University 50, Novorossiyskaya str., 50, Saint-Petersburg, 194021, Russia Tel.: +7-921-570-00-02 E-mail: kirillova_tv@spbstu.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0003-3148-2455		Кириллова Татьяна Викторовна — кандидат экономических наук, доцент, Высшая школа сервиса и торговли, Институт промышленного менеджмента, экономики и торговли, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого 194021, Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, 50 Тел.: +7-921-570-00-02 E-mail: kirillova_tv@spbstu.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0003-3148-2455	
Contribution		Критерии авторства	
Yuliya A. Dovganeva — investigation, writing (original draft) Yuliya V. Katrashova — conceptualization, investigation, writing (original draft) Tatyana V. Kirillova — methodology, writing (review and editing)		Довганёва Ю.А. — проведение исследования, подготовка первой версии статьи Катрашова Ю. В. — концептуализация, проведение исследования, подготовка первой версии статьи Кириллова Т. В. — методология, редактирование статьи	
Conflict of interest		Конфликт интересов	
The authors declare no conflict of interest.		Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-512-518>

Поступила 19.07.2023

Поступила после рецензирования 05.12.2023

Принята в печать 07.12.2023

© Свириденко Г. М., Шухалова О. М., Данилова Е. С., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ И МЕТАБОЛИЗМА ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО ЖИДКОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Свириденко Г. М.*, Шухалова О. М., Данилова Е. С.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, Углич, Ярославская область, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

модельные молочные
среды, штаммы
Streptococcus
thermophilus,
количество клеток,
кислотообразующая
активность,
гликолиз, протеолиз,
липолиз, образование
вкусоароматических
веществ

Микрофлора большинства ферментируемых молочных продуктов, в том числе сыров, полностью состоит из молочнокислых бактерий, т. е. специально вносимых в смесь бактериальных заквасок с различным видовым и штаммовым составом. Видовой состав закваски должен обеспечить интенсивность и направленность микробиологических и биохимических процессов вырабатываемого продукта и гарантировать его безопасность, качество и хранимостепособность. В частности, молочнокислые бактерии осуществляют преобразование основных компонентов молока (белка, молочного жира, лактозы) во вкусовые, ароматические, биологически активные вещества, участвующие в формировании идентификационных и органолептических показателей ферментируемых молочных продуктов. Количество заквасочных микроорганизмов в ферментируемых молочных продуктах, в том числе и сырах, значительно превышает содержание любой посторонней микрофлоры и может стать причиной появления таких органолептических пороков, как кислота, горечь, неспецифический посторонний привкус или избыточное газообразование. Способность микроорганизмов к образованию тех или иных продуктов метаболизма определяется как их видовыми и штаммовыми свойствами, так и условиями культивирования. К таковым относятся, прежде всего, состав среды развития и температурные режимы культивирования. Комбинируя состав закваски и подбирая благоприятные режимы культивирования микроорганизмов, можно добиться оптимального развития заквасочной микрофлоры, получив продукты с искомыми качественными характеристиками. В данной статье представлены результаты сравнительной оценки свойств производственных штаммов *Streptococcus thermophilus* в процессе их развития в молочных средах при оптимальных температурах (41 ± 1) °C, имитирующих условия производства кисломолочных продуктов, а также в режимах, имитирующих условия созревания сыров (11 ± 1) °C и концентрации поваренной соли 4%. Также проводилась оценка характера ферментативных процессов гликолиза, протеолиза, липолиза и вкусообразования в результате метаболизма данных культур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FNEN-2019-0010 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 19.07.2023

Accepted in revised 05.12.2023

Accepted for publication 07.12.2023

© Sviridenko G. M., Shukhalova O. M., Danilova E. S., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

PECULIARITIES OF DEVELOPMENT AND METABOLISM OF *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* STRAINS UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF DEEP LIQUID PHASE CULTIVATION

Galina M. Sviridenko*, Olga M. Shukhalova, Ekaterina S. Danilova

All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking, Uglich, Russia

KEY WORDS:

model dairy
media, strains
of *Streptococcus*
thermophilus,
cell number,
acid-forming activity,
glycolysis, proteolysis,
lipolysis, formation
of flavoring substances

ABSTRACT

The microflora of most fermented dairy products, including cheeses, consists entirely of lactic acid bacteria, i. e., bacterial starter cultures with different species and strain composition that are specially introduced into the mixture. The species composition of the starter must ensure the intensity and direction of the microbiological and biochemical processes of the produced product and guarantee its safety, quality and storability. In particular, lactic acid bacteria transform the main components of milk (protein, milk fat, lactose) into taste, aromatic, and biologically active substances involved in the formation of identification and organoleptic characteristics of fermented dairy products. The number of starter microorganisms in fermented dairy products, including cheeses, significantly exceeds the content of any foreign microflora and can cause the appearance of organoleptic defects such as acid, bitterness, non-specific off-taste or excessive gas formation. The ability of microorganisms to form certain metabolic products is determined both by their species and strain properties, and by cultivation conditions. These include, first of all, the composition of the development environment and temperature conditions of cultivation. By combining the composition of the starter and selecting favorable modes for cultivating microorganisms, it is possible to achieve optimal development of the starter microflora, obtaining products with the desired quality characteristics. This article presents the results of a comparative assessment of the properties of production strains of *Streptococcus thermophilus* during their development in dairy environments at optimal temperatures (41 ± 1) °C, simulating conditions for the production of fermented milk products, as well as in modes simulating cheese ripening conditions (11 ± 1) °C and 4% table salt concentration. The nature of the enzymatic processes of glycolysis, proteolysis, lipolysis, and flavor formation as a result of the metabolism of these cultures was also assessed.

FUNDING: The article was prepared as part of the research under the state assignment No. FNEN-2019-0010 of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Свириденко, Г. М., Шухалова, О. М., Данилова, Е. С. (2023). Особенности развития и метаболизма штаммов *Streptococcus thermophilus* в разных условиях глубинного жидкофазного культивирования. Пищевые системы, 6(4), 512-518. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-512-518>

FOR CITATION: Sviridenko, G. M., Shukhalova, O. M., Danilova, E. S. (2023). Peculiarities of development and metabolism of *streptococcus thermophilus* strains under different conditions of deep liquid phase cultivation. Food Systems, 6(4), 512-518. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-512-518>

1. Введение

Основой бактериальных заквасок, используемых при производстве ферментированной молочной продукции, являются кислотообразующие заквасочные микроорганизмы. Их главная функция — сбраживание лактозы и обеспечение необходимого уровня молочнокислого процесса, регламентируемого технологическими инструкциями по производству конкретного вида продукта [1]. В работах [2,3] описываются функциональные характеристики заквасочных микроорганизмов как необходимых компонентов производства ферментированной молочной продукции.

Вещества, образующиеся в результате сбраживания лактозы, не только играют важную роль в формировании вкуса, аромата, консистенции и рисунка сыров, но и в значительной степени определяют направленность физико-химических, биохимических и микробиологических процессов во время созревания сыров. Steele с соавторами [4] в своем обзоре подробно рассматривают формирование вкуса и аромата сыров под действием заквасочной микрофлоры. Группой ученых под руководством Nayaloglu [5] проведены исследования турецкого сыра, изготовленного с использованием заквасочных микроорганизмов и без них. Было установлено, что применение заквасочных культур положительно повлияло на физико-химические, биохимические и органолептические свойства сыра, в том числе на уровень растворимого азота, трихлоруксусной кислоты и накопления свободных аминокислот. Сыры, изготовленные без использования закваски, получили более низкие органолептические оценки [5].

В результате накопления молочной кислоты и снижения активной кислотности, по данным Гудкова А. В. [6], создаются условия, подавляющие развитие микрофлоры порчи. Источником энергии для такой микрофлоры служат углеводы, а также инактивирующие щелочные протеазы, которые осуществляют неспецифический для сыра протеолиз, изменяющий структуру сырной массы.

Кислотообразующие молочнокислые бактерии, входящие в состав заквасок, преимущественно включают в себя виды *Lactococcus lactis* и *Streptococcus thermophilus* [6]. Термофильный стрептококк имеет большое значение для молочной промышленности, так как широко используется для производства ферментируемых молочных продуктов, в том числе сыров [7,8]. В публикациях [9,10] дается представление о микробиоте молока и сыра, а также об их структурной и функциональной динамике в связи с различными технологиями сыроделия и влияющими на них переменными.

Бактерии рода *Streptococcus*, в соответствии с «Определителем бактерий Берджи», относятся к группе 17 «Грамположительные кокки» и являются гомоферментативными грамположительными факультативно анаэробными каталазаотрицательными молочнокислыми микроорганизмами. С точки зрения конструктивного и энергетического метаболизма *Streptococcus thermophilus* относится к хеноорганогетеротрофным бактериям, т. е. для роста и развития нуждается в средах, богатых органическими веществами и в первую очередь углеводами и белками. Для данного вида молочнокислых микроорганизмов характерен энергетический метаболизм бродильного типа, а конечными продуктами сбраживания лактозы являются лактаты, при этом процесс гликолиза проходит без газообразования [11]. Температурный диапазон роста *Streptococcus thermophilus* составляет от 15 до 55 °C, а предельная кислотность при развитии в молоке не превышает 100–140 °T. Наиболее активные кислотообразующие штаммы *Streptococcus thermophilus* при оптимальной температуре 40–42 °C свертывают молоко за 6–8 часов. Есть данные о чувствительности термофильного стрептококка к повышенным концентрациям соли (более 4,0%) [6].

Streptococcus thermophilus традиционно используется в сочетании с *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* или *Lactobacillus helveticus* для производства йогурта и сыров с высокой температурой второго нагревания, таких как эмменталь, грюйер и др. Включение термофильного стрептококка в состав закваски для изготовления сыров с чеддеризацией и термомеханической обработкой сырной массы ускоряет процессы сбраживания лактозы во время выработки продукта. Однако для полутвердых созревающих сыров с низкой температурой второго нагревания, таких как костромской, голландский, российский и др., основой бактериальных заквасок являются мезофильные лактококки вида *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus cremoris* [12]. Использование в составе заквасок для этих сыров *Streptococcus thermophilus* приводит к излишнему повышению уровня молочнокислого процесса, к ухудшению их качества, к появлению таких пороков, как кислый пустой вкус, щелевидный или сетчатый рисунок, мажущая или грубая консистенция [13].

Многие штаммы термофильного стрептококка вызывают свертывание молока с появлением вязких, иногда тягучих сгустков. Это связано с их способностью образовывать полисахариды в молоке, ко-

торые содержат галактозу и глюкозу, а также небольшие количества ксилозы, арабинозы, рамнозы и маннозы [14]. Поэтому при подборе штаммов термофильного стрептококка в состав заквасок для производства определенных видов ферментируемых молочных продуктов их необходимо дифференцировать на «вязкие» и «невязкие» штаммы. Так, благодаря способности вязких штаммов влиять на состояние сгустка, термофильный стрептококк часто используют в составе заквасок для кисломолочных продуктов, в том числе для йогуртов и сметаны с целью улучшения консистенции. Применение вязких штаммов в составе закваски для производства сыра недопустимо [15].

Способность микроорганизмов накапливать те или иные продукты метаболизма во многом определяется как их свойствами, так и условиями культивирования. Комбинируя видовой и штаммовый составы заквасочной микрофлоры с учетом условий развития при производстве конкретного вида ферментируемой молочной продукции, можно добиться высокого качества и искомых органолептических показателей.

Научный интерес к проведению многочисленных исследований, направленных на раскрытие значимых аспектов физиологии конкретных штаммов термофильного стрептококка, вызван видовыми особенностями *Streptococcus thermophilus*: термостабильностью и высокой скоростью кислотообразования, особенностями метаболизма сахаров, а также способностью стрептококка продуцировать ряд важных метаболитов, влияющих на потребительские свойства ферментированных молочных продуктов [16,17]. Кроме того, на сегодняшний день наблюдается растущий спрос на качественную молочную продукцию.

Цель данной работы заключается в проведении сравнительных исследований особенностей развития и метаболизма производственных штаммов *Streptococcus thermophilus* в процессе их развития в молочных средах в оптимальных условиях, имитирующих условия производства кисломолочных продуктов, и в режимах, имитирующих условия созревания сыров.

В задачи исследований входили:

- сравнительная оценка динамики развития производственных штаммов *Streptococcus thermophilus* в молочных средах при оптимальных температурах культивирования (41 ± 1) °C, а также в режимах созревания сыров при (11 ± 1) °C и с концентрацией поваренной соли 4%;
- оценка интенсивности и направленности ферментативных процессов (таких как гликолиз, протеолиз, липолиз) и изучение накопления вкусоароматических веществ в результате метаболизма данных культур в условиях глубинного жидкофазного культивирования в молочных средах при разных температурных режимах.

2. Объекты и методы

Для исследований выбрано три производственных штамма заквасочных микроорганизмов *Streptococcus thermophilus* (223₁₅, 742₃, 115₄), регулярно включаемых в состав бактериальных заквасок. Динамику развития микроорганизмов и накопления продуктов метаболизма изучали, культивируя штаммы в стерильном молоке при заражении 1% активной культуры. При проведении эксперимента исходили из того, что разные штаммы при культивировании в молоке при оптимальных условиях и в условиях, имитирующих процесс созревания сыра, могут по-разному развиваться и метаболизировать углеводы, белки и жиры молока.

Для проведения экспериментов цельное сырое молоко стерилизовали при (121 ± 1) °C с выдержкой 15 мин, что исключает наличие остаточной микрофлоры и ее влияние на результат. Культивирование штаммов термофильного стрептококка в стерилизованном молоке осуществляли в течение 10 суток, как при оптимальной температуре развития (41 ± 1) °C и при отсутствии поваренной соли, так и при технически значимой температуре (11 ± 1) °C и с концентрацией поваренной соли 4%, что соответствует условиям созревания сыров. Количество жизнеспособных клеток и кислотообразующую активность исследуемых культур контролировали в динамике через 6, 12, 24, 48, 72, 69, 168, 240 часов.

Количество жизнеспособных клеток определяли путем посева разведений на твердую питательную среду для выявления молочнокислых микроорганизмов по ГОСТ 33951–2016¹.

Титруемую кислотность в молочных средах устанавливали по ГОСТ 3624–92².

¹ ГОСТ 33951–2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов». — М.: Стандартинформ, 2016. — 10 с.

² ГОСТ 3624–92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности». — М.: Стандартинформ, 2009. — 8 с.

Определение массовой доли лактозы, глюкозы, галактозы и молочной кислоты проводили при помощи системы капиллярного электрофореза серии «Капель-105М» («Люмэкс-Маркетинг», Россия).

Для установления характеристики процесса протеолиза, который также может повлиять на накопление вкусо-ароматических веществ, дополнительно исследовали изменение белковой фракции молока, оценивая методом Кьельдаля массовую долю общего азота по ГОСТ 23327–98³, небелкового азота — по ГОСТ Р 55246–2012⁴.

Молекулярно-массовое распределение растворимых азотистых соединений определяли методом гель-фильтрации на колонке Superose 12 10/300 GL с использованием прецизионного плунжерного насоса P-500 (Amersham Pharmacia, Швеция), УФ-детектора LKB Uvicord-III с блоком измерения и блоком управления. Гель-фильтрация относится к жидкостной хроматографии, в ходе которой молекулы анализируемой смеси разделяются по размеру за счет разной способности проникать в поры хроматографической (гель-фильтрационной) матрицы. Подготовка образца для гель-фильтрации включает обезжиривание пробы, взятие навески обезжиренной пробы, растворение ее в буферном растворе, отделение нерастворимых в воде фракций фильтрованием или центрифугированием. Элюент — водный раствор 0,05 М Na₂HPO₄ + 0,15 М NaCl, скорость подачи элюента — 0,5 мл/мин; длина волны детектора — 280 нм.

Определение жирнокислотного состава жировой фазы осуществляли методом газовой хроматографии по ГОСТ 32915–2014⁵. Использовали газовый хроматограф «Хромос ГХ-1000» («Хромос Инжиниринг», Россия), колонку CP-Sil 88 for FAME100m×0.25mm×0.2μm (Agilent Technologies, США). Объем вводимой пробы — 1 мм³; температура инжектора — 220 °C; газ-носитель — азот. Метилловые эфиры жирных кислот получали из триглицеридов переэтерификацией с метанольным раствором метилата натрия. Для идентификации метиловых эфиров жирных кислот применяли стандартную смесь Supelko 37 Component FAME Mix (Supelko, США). Расчет полученных данных проводили методом внутренней нормализации в программе «Хромос».

Качественный анализ вкусо-ароматических веществ в паровой фазе продукта проводили с использованием газового хроматографа «Цвет-800» (ОАО «Цвет», Россия) и устройства для равновесного пара, предназначенного для отбора пара, который находится в термодинамическом равновесии с жидкой конденсированной фазой с последующим дозированием отобранного пара в аналитическую колонку газового хроматографа. Метод основан на термостатировании пробы продукта в замкнутом сосуде с последующим газохроматографическим определением в паровой фазе пробы продукта индивидуальных компонентов летучих вкусоароматических веществ и их идентификации с использованием пламенно-ионизационного

детектора. Анализировали пробу исследуемого объекта массой 3 г, предварительно нагретую на водяной бане до 50 °C. Непосредственно перед проведением анализа пробу встряхивали для установления термодинамического равновесия. Длительность анализа 900 сек. Обработку полученных данных осуществляли методом внутренней нормализации с помощью программы «Цвет-Аналитик» (Россия) с последующей идентификацией.

Достоверность полученных данных подтверждается проведением экспериментов не менее чем в 3-кратной повторности с применением современных методов анализа, технологического оборудования и приборов, а также статистической обработки результатов исследований с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010. Для попарного сравнения выборок разного размера и оценки статистически значимых различий между образцами применяли HSD тест (критерий Тьюки). Уровень значимости принимали как $p \leq 0,05$. Результаты экспериментальных данных представлены в формате «среднее значение ± стандартное отклонение».

3. Результаты и обсуждение

Средние значения динамики развития трех штаммов *Streptococcus thermophilus* по количеству жизнеспособных клеток и молочнокислого процесса по изменению титруемой кислотности представлены на Рисунках 1 и 2.

Экспериментальные результаты показывают, что для всех исследованных штаммов *Streptococcus thermophilus* при оптимальных температурных режимах культивирования в молоке максимальный урожай клеток (Рисунок 1) составляет более 10^9 КОЕ/см³, для штаммов 223₁₅ и 115₄ данный показатель достигается к 8–12 часам культивирования, а для штамма 742₃ — к 18–24 часам. После достижения максимума развития штаммы *Streptococcus thermophilus* переходят к стадии вымирания, минуя стационарную фазу. Скорость вымирания клеток при оптимальных температурах культивирования крайне значительна, и к 96 часам с момента начала культивирования количество жизнеспособных клеток снижается на 5–6 порядков. При температуре культивирования (11 ± 1) °C в молочной среде с 4% NaCl все без исключения штаммы *Streptococcus thermophilus* не размножаются, о чем свидетельствует полное отсутствие увеличения количества жизнеспособных клеток и прироста титруемой кислотности.

Через 6–8 часов с начала культивирования в оптимальных температурных режимах разброс показателей титруемой кислотности (Рисунок 2) между штаммами значителен и колеблется в зависимости от штамма от (70 ± 2) °T до (90 ± 4) °T. Максимальное значение титруемой кислотности для всех исследуемых штаммов *Streptococcus thermophilus* достигается к 12–16 часам культивирования и в среднем составляет (106 ± 5) °T.

В условиях развития штаммов термофильного стрептококка в молочной среде, имитирующих режимы созревания сыра, т. е. при температуре культивирования (11 ± 1) °C с 4% NaCl, процесс сбраживания лактозы, как и молочнокислый процесс, отсутствует, что подтверждается данными, представленными в Таблице 1.

В вариантах, где *Streptococcus thermophilus* развивались в условиях оптимальной температуры, независимо от штамма, лактоза через 24 часа сбраживалась только на 33,9–26,9% от исходного количества.

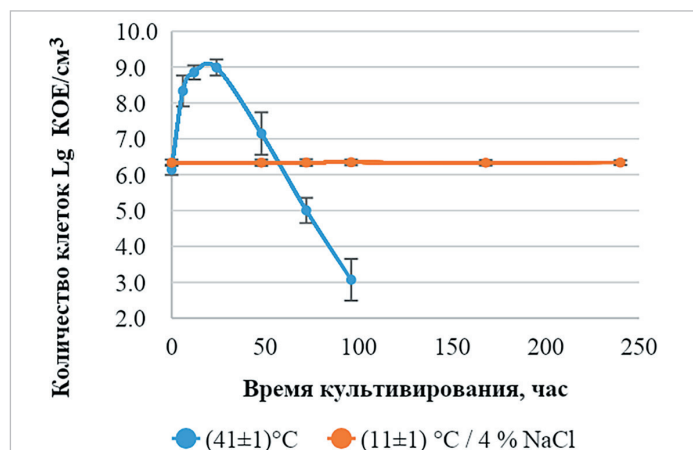


Рисунок 1. Средние значения динамики изменения количества жизнеспособных клеток, lg КОЕ/см³

Figure 1. Average values of the dynamics of changes in the number of viable cells, lg CFU/cm³

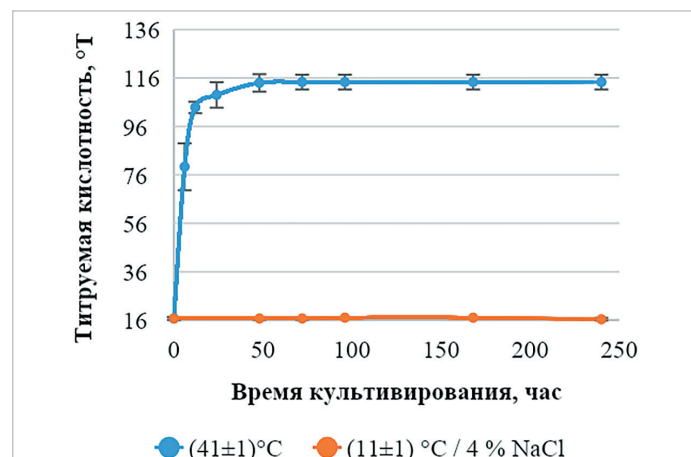


Рисунок 2. Средние значения динамики изменения титруемой кислотности, (°T)

Figure 2. Average values of the dynamics of changes in titratable acidity, (°T)

ва. Установлено, что все штаммы термофильного стрептококка при температуре $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ в процессе сбраживания лактозы не способны метаболизировать галактозу, что приводит к ее накоплению и к образованию меньшего количества молочной кислоты.

При развитии молочнокислых микроорганизмов в молоке происходит частичный гидролиз белков молока и переход части белка из нерастворимого состояния в растворимое. Данный процесс протекает под воздействием протеолитически активных экзоферментов, продуцируемых штаммами термофильного стрептококка в процессе развития. По литературным данным, наиболее активный протеолиз наблюдается в начале логарифмической фазы развития культуры, что свидетельствует о том, что белок в молоке расщепляется в основном протеазами растущих клеток [6].

В условиях эксперимента протеолитическую активность штаммов *Streptococcus thermophilus* оценивали по увеличению процентного содержания небелкового азота, что иллюстрирует частичную трансформацию белков молока в небелковые азотистые соединения, такие как свободные аминокислоты, пептиды и аммонийные соединения [18]. Результаты исследований приведены в Таблице 2.

Данные Таблицы 2 показывают, что испытанные штаммы *Streptococcus thermophilus* в оптимальных условиях культивирования $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ обладают слабой протеолитической активностью, о чем свидетельствует незначительный прирост небелкового азота в сравнении с его количеством в исходном молоке. При $(11 \pm 1)^\circ\text{C} / 4\% \text{ NaCl}$ в молочных средах у всех исследуемых штаммов процесс протеолиза, как и гликолиз, отсутствует.

Оценка изменения массовой доли небелкового азота недостаточно отражает степень протеолитического влияния на белки молока, поэтому для получения более подробной информации авторы определяли пептидный профиль в модельных молочных средах после культивирования штаммов *Streptococcus thermophilus* в течение 10 суток. Данные представлены на Рисунке 3.

Результаты молекулярно-массового распределения продуктов гидролиза белка (Рисунок 3), показывают, что все исследуемые штаммы термофильного стрептококка, независимо от условий культивирования, не проявляют существенной протеолитической активности.

Наибольшая протеолитическая активность отмечалась у *Streptococcus thermophilus* штамма 115₄, а наименьшая — у *Streptococcus thermophilus* 742₃.

Полученные результаты подтверждают данные о том, что штаммы *Streptococcus thermophilus* обладают крайне низкой протеолитической активностью, поэтому способны продуцировать в процессе развития в молочной среде даже при оптимальных температурах небольшое количество продуктов гидролиза белка [19,20].

Микроорганизмы, развиваясь в молоке и сыре, могут воздействовать и на его жировую составляющую, т. е. проявлять липолитическую активность, что важно, с одной стороны, для оценки степени зрелости сыров, а с другой — для определения хранимостехнологии молочных продуктов [21,22]. При этом в первую очередь гидролизу подвергаются так называемые «короткие» триглицериды, в состав которых входят низкомолекулярные жирные кислоты [23,24,25]. Свободные жирные кислоты легче вовлекаются в дальнейший процесс биохимических превращений и становятся источником образования спиртов, альдегидов и кетонов, а также способствуют трансформации ненасыщенных жирных кислот в насыщенные, что может быть причиной изменения соотношения жирных кислот в ферментированных молочных продуктах [26].

Проведены исследования жирнокислотного состава жировой фазы молока в сравнении с молочным жиром, ферментированным штаммами *Streptococcus thermophilus* в течение 10 суток при температуре $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ и в условиях, имитирующих процесс созревания сыров. Данные изменения жирнокислотного состава молочных сред под действием штаммов *Streptococcus thermophilus* представлены на Рисунке 4.

Данные, представленные на Рисунке 4, свидетельствуют о том, что, независимо от условий культивирования, штаммы *Streptococcus thermophilus* не проявляют липолитической активности относительно молочного жира.

Факт отсутствия липолитической активности позволяет заключить, что формирование в молоке летучих вкусоароматических веществ, таких как альдегиды, кетоны, спирты и органические кислоты, происходит в результате более глубокого разложения продуктов гликолиза и частично протеолиза.

Проведенные исследования состава летучих вкусо-ароматических веществ в молочных средах включали культивирование исследуемых штаммов *Streptococcus thermophilus* при разных режимах в течение 10 суток. Результаты данных исследований представлены в Таблице 3.)

Общее содержание вкусоароматических веществ в молоке в процессе развития штаммов *Streptococcus thermophilus* (Таблица 3) при оптимальной температуре культивирования относительно исходного молока увеличилось на $(0,35 \pm 0,02)$ нА • с. Под действием ферментов *Streptococcus thermophilus* в молочной среде при температуре $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ образуется широкий спектр различных летучих вкусоароматических соединений, представленных альдегидами и кетонами. Обнаруженные с помощью газо-жидкостной хроматографии равновесного пара альдегиды включают этаналь, бутаналь, пропаналь, бутаналь-2; кетоны бутанон-2 и гептанон-2. В процессе культивиро-

Таблица 1. Динамика процесса гликолиза в модельных молочных средах под действием штаммов *Streptococcus thermophilus*

Table 1. Dynamics of the process of glycolysis in model dairy media under the influence of strains of *Streptococcus thermophilus*

Образец	Условия культивирования	Лактоза, %	Галактоза, %	Молочная кислота, %
Молоко — контроль	—	$4,34 \pm 0,02^a$	—	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> 223 ₁₅	$(41 \pm 1)^\circ\text{C}$	$2,53 \pm 0,01^b$	$0,72 \pm 0,01^a$	$0,78 \pm 0,01^a$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 223 ₁₅	$(11 \pm 1)^\circ\text{C} / 4\% \text{ NaCl}$	$4,33 \pm 0,02^c$	—	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> 742 ₃	$(41 \pm 1)^\circ\text{C}$	$2,58 \pm 0,01^b$	$0,73 \pm 0,01^a$	$0,78 \pm 0,02^a$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 742 ₃	$(11 \pm 1)^\circ\text{C} / 4\% \text{ NaCl}$	$4,34 \pm 0,03^c$	—	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> 115 ₄	$(41 \pm 1)^\circ\text{C}$	$2,93 \pm 0,01^d$	$0,58 \pm 0,02^b$	$0,62 \pm 0,02^b$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 115 ₄	$(11 \pm 1)^\circ\text{C} / 4\% \text{ NaCl}$	$4,31 \pm 0,03^c$	—	—

Примечание: значения с одинаковым индексом в одном столбце статистически значимо не отличаются ($p > 0,05$).

Таблица 2. Изменение массовой доли общего и небелкового азота в модельных молочных средах с внесенными штаммами *Streptococcus thermophilus*

Table 2. Changes in the mass fraction of total and non-protein nitrogen in model dairy media with introduced strains of *Streptococcus thermophilus*

Образец	Условия культивирования	Массовая доля общего азота, %	Массовая доля небелкового азота, %	Массовая доля небелкового азота в общей м. д. азота, %
Молоко контроль	—	$0,464 \pm 0,017^a$	$0,017 \pm 0,02^a$	$3,66 \pm 0,21^a$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 115 ₄	$(41 \pm 1)^\circ\text{C}$	$0,468 \pm 0,024^a$	$0,033 \pm 0,03^b$	$7,05 \pm 0,33^b$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 115 ₄	$(11 \pm 1)^\circ\text{C} / 4\% \text{ NaCl}$	$0,464 \pm 0,018^a$	$0,018 \pm 0,01^a$	$4,09 \pm 0,11^c$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 742 ₃	$(41 \pm 1)^\circ\text{C}$	$0,466 \pm 0,011^a$	$0,025 \pm 0,01^c$	$5,36 \pm 0,14^d$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 742 ₃	$(11 \pm 1)^\circ\text{C} / 4\% \text{ NaCl}$	$0,462 \pm 0,021^a$	$0,017 \pm 0,02^a$	$3,67 \pm 0,26^a$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 223 ₁₅	$(41 \pm 1)^\circ\text{C}$	$0,461 \pm 0,016^a$	$0,027 \pm 0,02^c$	$5,85 \pm 0,11^o$
<i>Streptococcus thermophilus</i> 223 ₁₅	$(11 \pm 1)^\circ\text{C} / 4\% \text{ NaCl}$	$0,466 \pm 0,012^a$	$0,017 \pm 0,01^a$	$3,64 \pm 0,13^a$

Примечание: значения с одинаковым индексом в одном столбце статистически значимо не отличаются ($p > 0,05$).

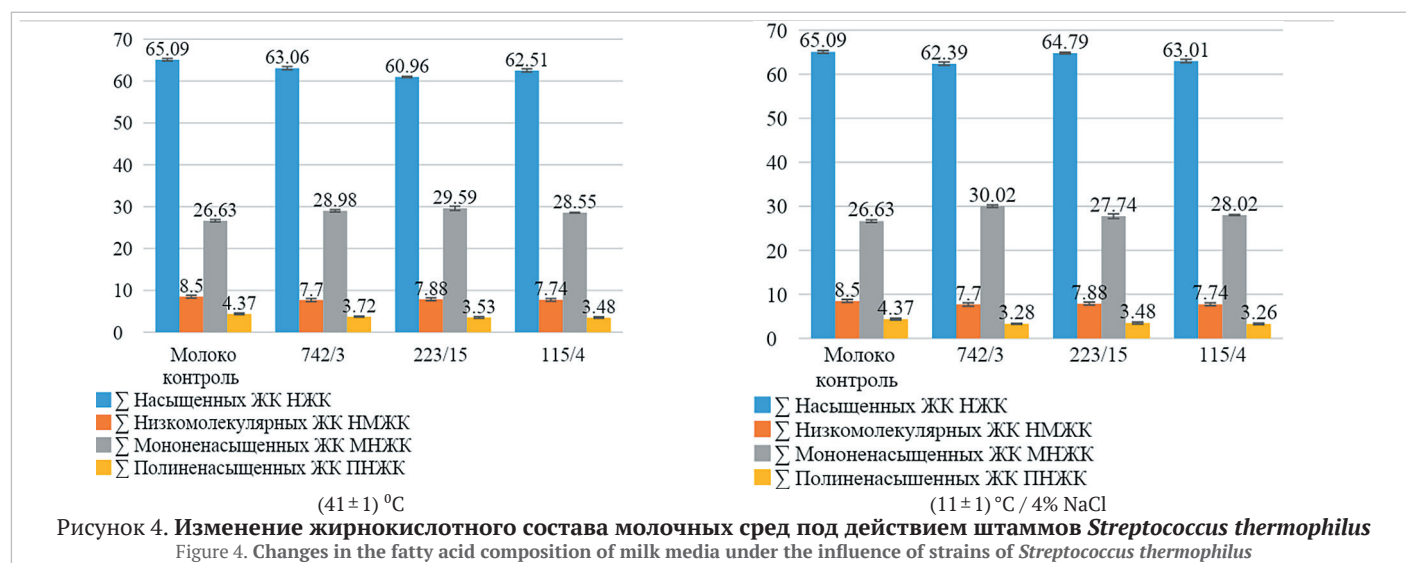
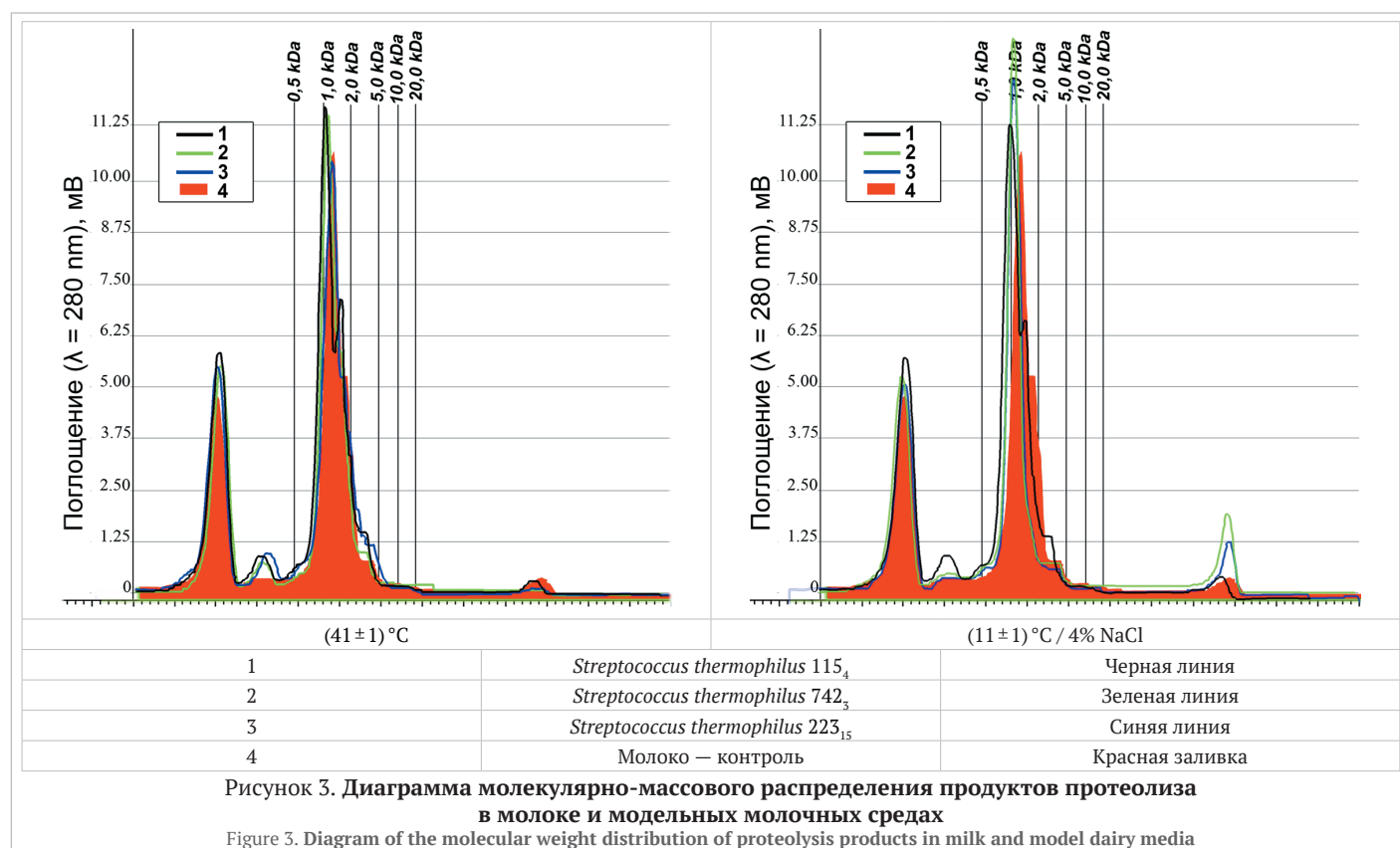


Таблица 3. Содержание вкусоароматобразующих веществ в паровой фазе молочных сред с внесенными штаммами *Streptococcus thermophilus*

Table 3. The content of flavoring substances in the vapor phase of dairy media with strains of *Streptococcus thermophilus* introduced

Образец	Общее к-во ЛВБВ, нА-с	Альдегиды, % от ВБВ				Кетоны, % от ВБВ		К-ты, % от ВБВ
		Этаналь	Бутаналь	Пропаналь	Бутаналь-2	Бутанон-2	Гептанон-2	
Молоко-контроль	0,12±0,01	0,27±0,05	26,62±0,12	28,62±0,21	7,55±0,02	—	4,91±0,11	0,37±0,02
<i>Streptococcus thermophilus</i> 223 ₁₅ (41±1) °C	0,47±0,03	75,35±0,16	14,09±0,05	—	1,92±0,09	2,58±0,07	6,09±0,19	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> 223 ₁₅ (11±1) °C / 4% NaCl	0,11±0,01	0,28±0,11	25,62±0,24	27,79±0,13	7,57±0,11	—	4,93±0,01	0,33±0,11
<i>Streptococcus thermophilus</i> 742 ₃ (41±1) °C	0,42±0,03	78,54±0,01	10,79±0,15	—	1,97±0,17	2,44±0,01	6,02±0,08	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> 742 ₃ (11±1) °C / 4% NaCl	0,12±0,01	0,26±0,03	26,83±0,09	28,39±0,16	7,47±0,08	—	4,90±0,03	0,35±0,03
<i>Streptococcus thermophilus</i> 115 ₄ (41±1) °C	0,45±0,02	79,51±0,06	9,77±0,06	—	1,84±0,12	2,52±0,03	6,11±0,02	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> 115 ₄ (11±1) °C / 4% NaCl	0,10±0,01	0,28±0,05	26,89±0,09	27,17±0,18	7,65±0,07	—	4,89±0,13	0,39±0,01

вания во всех исследуемых штаммах *Streptococcus thermophilus* были отмечены следующие изменения: появление бутанона-2, увеличение количества этанала и гептанона-2, снижение содержания бутанала и бутенала-2, а также полная утилизация пропаналя и масляной кислоты. Преобладающим вкусом-ароматическим соединением является этаналь, который составляет (77,8 ± 1,7)% от веществ общего количества. Полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что ацетальдегид, или этаналь, является ключевым ароматическим соединением в кисломолочных продуктах [27,28,29]. В условиях, имитирующих процессы созревания сыров (11 ± 1) °C / 4% NaCl, во всех штаммах *Streptococcus thermophilus* общее количество вкусоароматических веществ и их соотношение остаются на исходном уровне.

3. Выводы

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что:

- динамика развития и кислотообразования исследуемых штаммов *Streptococcus thermophilus* в молоке при оптимальных условиях культивирования (41 ± 1 °C) зависит от свойств конкретных штаммов, входящих в состав бактериальных заквасок;
- в модельной молочной среде, имитирующей условия созревания сыров, процессы как кислотообразования, так и развития штаммов *Streptococcus thermophilus* полностью отсутствуют;

- процесс гликолиза, то есть гидролиз лактозы, независимо от исследуемых штаммов, протекает с образованием галактозы как промежуточного продукта гликолиза. Лактоза сброжена на (30 ± 4)%, что обусловлено незначительной буферностью молочной среды;
- исследуемые штаммы *Streptococcus thermophilus* не проявляют липолитической и обладают слабой протеолитической активностью;
- образование летучих вкусоароматических веществ в молоке под действием штаммов *Streptococcus thermophilus* при оптимальных условиях культивирования (41 ± 1 °C) происходит за счет глубокой деградации продуктов гликолиза и протеолиза.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают целесообразность использования термофильного стрептококка в качестве кислотообразующих заквасочных микроорганизмов при производстве ферментируемых молочных продуктов, с учетом необходимости подбора штаммов *Streptococcus thermophilus* по их скорости развития кислотообразования. Однако невозможность развития и метаболизма штаммов термофильного стрептококка в молочных средах в условиях, имитирующих режимы созревания сыров, а также практическое отсутствие протеолитической и липолитической активностей относительно белков молока и молочного жира говорят о нецелесообразности рассмотрения *Streptococcus thermophilus* в качестве созревающей культуры в сыроделии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Перфильев, Г. Д., Свириденко, Ю. Я. (2006). Производство и применение бактериальных концентратов. *Сыроделие и маслоделие*, 3, 24–29.
2. Wedajo, B. (2015). Lactic acid bacteria: Benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics and Health*, 3(2), Article 1000129. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000129>
3. González-González, F., Delgado, S., Ruiz, L., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. (2022). Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 212–229. <https://doi.org/10.1111/jam.15510>
4. Steele, J., Broadbent, J., Kok, J. (2013). Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.12.001>
5. Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (2005). Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish white-brined cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3460–3474. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73030-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73030-7)
6. Гудков, А. В. (2004). Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. М.: ДеЛи принт, 2004.
7. Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N. et al. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 435–463. <https://doi.org/10.1016/j.fmr.2005.04.008>
8. Сорокина, Н. П. (2013). Обзор рынка бактериальных заквасок. *Сыроделие и маслоделие*, 4, 10–13.
9. Gobetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P. F., De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assemble the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>
10. Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D. et al. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, Article 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>
11. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams and Wilkins, 1994.
12. Сорокина, Н. П., Кураева, Е. В., Кучеренко, И. В. (2016). Бактериальные закваски для производства сыров. *Сыроделие и маслоделие*, 4, 26–31.
13. Knight, G. C., Nicol, R. S., McMeekin, T. A. (2004). Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. *International Journal of Food Microbiology*, 93(3), 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2003.11.013>
14. Xu, Z., Guo, Q., Zhang, H., Wu, Y., Hang, X., Ai, L. (2018). Exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S-3: Molecular, partial structural and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 194, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.014>
15. Cui, Y., Jiang, X., Hao, M., Qu, X., Hu, T. (2017). New advances in exopolysaccharides production of *Streptococcus thermophilus*. *Archives of Microbiology*, 199, 799–809. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1366-1>
16. Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Kulakauskas, S. et al. (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1554–1558. <https://doi.org/10.1038/nbt1034>
17. Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A. A., Neves, A. R. (2020). Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.019>
18. Töpel, A. (1976). *Chemie und Physik der Milch*. Fachbuchverlag, 1976. (In German)
19. Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, J. M., Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L. D. C., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A. (2018). Proteolytic system of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(10), 581–1588. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07017>
20. Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Lecomte, X., Miclo, L., Dary-Mourot, A. (2019). The X-prolyl dipeptidyl-peptidase PepX of *Streptococcus thermophilus* initially described as intracellular is also responsible for peptidase extracellular activity. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 113–123. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14823>
21. Тишкина, Т. Н., Вельматов, А. А., Ерофеев, В. И. (2023). Влияние периода года на жирнокислотный состав молочного жира и качество масла. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*, 1(61), 155–160. <https://doi.org/10.18286/1816-4501-2023-1-155-160>
22. Topnikova, E. V., Zabolotin, G. Y., Danilova, E. S., Dunaev, A. V. (2022). Influence of diets, lactating animal breeds and seasons of the year on the fatty acid composition of cow milk. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1052(1), Article 012042. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1052/1/012042>
23. Wu, S. L., Sun, J., Chen, X., Wei, W., Song, L., Dai, X. et al. (2020). Unveiling the mechanisms of medium-chain fatty acid production from waste activated sludge alkaline fermentation liquor through physiological, thermodynamic and metagenomic investigations. *Water Research*, 169(1), Article 115218. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115218>
24. Ариповский, А. В., Титов, В. Н. (2013). Физиология среднепочечных жирных кислот. Физиология, особенности метаболизма и применение в клинике. Клиническая лабораторная диагностика, 6, 3–10.
25. Roopashree, P. G., Shetty, S. S., Kumari, N. S. (2021). Effect of medium chain fatty acid in human health and disease. *Journal of Functional Foods*, 87, Article 104724. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104724>
26. Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V. L., Delabre, M. L., Lubbers, M., Bennett, M. et al. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 711–718. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.012>
27. Zha, M., Yu, J., Zhang, Y., Wang, H., Bai, N., Qin, Y. et al. (2015). Study on *Streptococcus thermophilus* isolated from Qula and associated characteristic of acetaldehyde and diacetyl in their fermented milk. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 61(2), 50–56. <https://doi.org/10.2323/jgam.61.50>
28. Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2001). Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, 72(1), 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00203-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00203-X)
29. Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5656–5662. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5656-5662.2002>

REFERENCES

1. Perfil'ev, G. D., Sviridenko, Yu. Ya. (2006). Production and applications of bacteriological concentrates. *Cheesemaking and Buttermaking*, 3, 24–29. (In Russian)
2. Wedajo, B. (2015). Lactic Acid bacteria: Benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics and Health*, 3(2), Article 1000129. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000129>
3. González-González, F., Delgado, S., Ruiz, L., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. (2022). Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 212–229. <https://doi.org/10.1111/jam.15510>
4. Steele, J., Broadbent, J., Kok, J. (2013). Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.12.001>
5. Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (2005). Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish white-brined

- cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3460–3474. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73030-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73030-7)
6. Gudkov, A. V. (2004). Cheese making: technological, biological and physico-chemical aspects. Moscow: DeLi print, 2004. (In Russian)
 7. Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N. et al. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 435–463. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.008>
 8. Sorokina, N. P. (2013). Review of the starter cultures market *Cheesemaking and Buttermaking*, 4, 10–13. (In Russian)
 9. Gobbeti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P. F., De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>
 10. Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D. et al. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, Article 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>
 11. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams and Wilkins, 1994.
 12. Sorokina, N. P., Kuraeva, E. V., Kucherenko, I. V. (2016). Bacterial starters for cheese production. *Cheesemaking and Buttermaking*, 4, 26–31. (In Russian)
 13. Knight, G. C., Nicol, R. S., McMeekin, T. A. (2004). Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. *International Journal of Food Microbiology* 93(3), 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.11.013>
 14. Xu, Z., Guo, Q., Zhang, H., Wu, Y., Hang, X., Ai, L. (2018). Exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S-3: Molecular, partial structural and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 194, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.014>
 15. Cui, Y., Jiang, X., Hao, M., Qu, X., Hu, T. (2017). New advances in exopolysaccharides production of *Streptococcus thermophilus*. *Archives of Microbiology*, 199, 799–809. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1366-1>
 16. Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Kulakauskas, S. et al. (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1554–1558. <https://doi.org/10.1038/nbt1034>
 17. Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A. A., Neves, A. R. (2020). Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.019>
 18. Töpel, A. (1976). *Chemie und Physik der Milch*. Fachbuchverlag, 1976. (In German)
 19. Rodriguez-Serrano, G. M., Garcia-Garibay, J. M., Cruz-Guerrero, A. E., Gomez-Ruiz, L. d. C., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A. (2018). Proteolytic system of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(10), 581–1588. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07017>
 20. Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Lecomte, X., Miclo, L., Dary-Mourot, A. (2019). The X-prolyl dipeptidyl-peptidase PepX of *Streptococcus thermophilus* initially described as intracellular is also responsible for peptidase extracellular activity. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 113–123. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14823>
 21. Tishkina, T. N., Velmatov, A. A., Erofeev, V. I. (2023). Effect of the year season on fatty acid composition of milk fat and butter quality. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 1(61), 155–160. <https://doi.org/10.18286/1816-4501-2023-1-155-160> (In Russian)
 22. Topnikova, E. V., Zabolotin, G. Y., Danilova, E. S., Dunaev, A. V. (2022). Influence of diets, lactating animal breeds and seasons of the year on the fatty acid composition of cow milk. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1052(1), Article 012042. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1052/1/012042>
 23. Wu, S. L., Sun, J., Chen, X., Wei, W., Song, L., Dai, X. et al. (2020). Unveiling the mechanisms of medium-chain fatty acid production from waste activated sludge alkaline fermentation liquor through physiological, thermodynamic and metagenomic investigations. *Water Research*, 169(1), Article 115218. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115218>
 24. Aripovsky, A. V., Titov, V. N. (2013). The medium chain fat acids. content in food. Physiology, characteristics of metabolism and application in clinical practice. *Clinical Laboratory Diagnostics*, 6, 3–10. (In Russian)
 25. Roopashree, P. G., Shetty, S. S., Kumari, N. S. (2021). Effect of medium chain fatty acid in human health and disease. *Journal of Functional Foods*, 87, Article 104724. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104724>
 26. Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V. L., Delabre, M. L., Lubbers, M., Bennett, M. et al. (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 711–718. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.012>
 27. Zha, M., Yu, J., Zhang, Y., Wang, H., Bai, N., Qin, Y. et al. (2015). Study on *Streptococcus thermophilus* isolated from Qula and associated characteristic of acet-aldehyde and diacetyl in their fermented milk. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 61(2), 50–56. <https://doi.org/10.2323/jgam.61.50>
 28. Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2001). Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, 72(1), 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00203-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00203-X)
 29. Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5656–5662. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5656-5662.2002>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Свириденко Галина Михайловна — доктор технических наук, главный научный сотрудник, руководитель направления микробиологических исследований молока и молочных продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-485-325-48-64 E-mail: g.sviridenko@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9586-3786 * автор для контактов Шухалова Ольга Михайловна — младший научный сотрудник, отдел микробиологии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-485-329-81-52 E-mail: o.shukhalova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7665-8517 Данилова Екатерина Сергеевна — научный сотрудник, отдел маслоделия, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-960-527-61-48 E-mail: e.danilova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5522-224X	Galina M. Sviridenko, Doctor of Technical Sciences, Leading Researcher, Head of Research Department of Microbiology, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-325-48-64 E-mail: g.sviridenko@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1231-8388 * corresponding author Olga M. Shukhalova, Junior Researcher, Department of Microbiology, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-485-329-81-52 E-mail: o.shukhalova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7665-8517 Ekaterina S. Danilova, Researcher, Buttermaking Department, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-960-527-61-48 E-mail: e.danilova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5522-224X
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-519-530>



Received 22.05.2023

Accepted for revised 01.12.2023

Accepted for publication 07.12.2023

© Luo D., Nikitina M. A., Xiao X., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

FLEXIBLE SENSORS FOR FOOD MONITORING. PART I: PRINCIPLE

Dongjie Luo¹, Marina A. Nikitina², Xinqing Xiao^{1*}

¹ College of Engineering, China Agricultural University, Beijing, P. R. China

² V.M. Gorbатов Federal Research Center for Foods Systems of RAS, Moscow, Russia

KEY WORDS:

flexible sensor, food monitoring, intrinsically stretchable, mechanical conformability, conductive electrode, electrical property, sensing mechanism, transduction mechanism

ABSTRACT

Monitoring and maintaining food quality, safety, and authenticity are the most important concerns in the food industry. The cutting-edge flexible sensors for food monitoring precisely meet the needs of acquiring information on multiple parameters in small space and more reasonable layout, providing data on mechanical deformations, and conformably attaching to arbitrarily curved surfaces. Flexible sensing materials with a large specific surface area, high carrier mobility and carrier density, dense active sites, outstanding tunability, and processability, such as two-dimensional carbon nanomaterials, conductive polymers, and nanohybrid materials, have further improved the sensitivity, stability, and selectivity of flexible sensors. This article attempts to critically review state-of-the-art developments with respect to materials, fabrication techniques, and sensing mechanisms of devices, as well as the applications of the electrically-transduced flexible sensors. In addition, this review elaborates on the transduction mechanisms of several typical transducers, with a focus on the physics behind, including the modulation of doping level, Schottky barrier, and interfacial layer that typically lead to changes in conductivity, work function, and permittivity. We also highlight the benefits, technical challenges with corresponding solutions of current flexible sensors, and discuss potential strategies to overcome limitations in energy consumption, quantify the trade-offs in maintaining quality and marketability, optimize wireless communication, and explore new sensing patterns.

Поступила 22.05.2023

Поступила после рецензирования 01.12.2023

Принята в печать 07.12.2023

© Luo Д., Никитина М. А., Сяо Ц., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

ГИБКИЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ: ЧАСТЬ 1 — ПРИНЦИП

Люо Д.¹, Никитина М. А.², Сяо Ц.^{1*}

¹ Инженерный колледж, Китайский сельскохозяйственный университет, Пекин, КНР

² Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

гибкий сенсор, мониторинг пищевых продуктов, эластичные по своей природе, механическое соответствие, проводящий электрод, электрическое свойство, сенсорный механизм, механизм преобразования

Мониторинг и поддержание качества, безопасности и аутентичности пищевых продуктов являются наиболее важными проблемными вопросами в пищевой промышленности. Самые современные гибкие сенсоры для мониторинга пищевых продуктов точно соответствуют потребностям в получении информации по многим параметрам в небольшом пространстве и более рациональном размещении, обеспечивая данные по механическим деформациям и прилегающей соответствующим образом к произвольно изогнутым поверхностям. Гибкие сенсорные материалы с большой удельной площадью поверхности, высокой мобильностью носителя и плотностью носителя, плотными активными точками, прекрасной настраиваемостью и технологичностью, такие как двумерные углеродные наноматериалы, проводящие полимеры и наногибридные материалы, дополнительно улучшили чувствительность, стабильность и селективность гибких сенсоров. В данной статье предпринята попытка критического обзора передовых разработок в отношении материалов, методов изготовления и сенсорных механизмов устройств, а также применений гибких сенсоров с электрическим преобразованием. Кроме того, в данном обзоре рассмотрены механизмы преобразования некоторых типовых преобразователей с акцентом на лежащую в основе физику, включая модуляцию уровня легирования, барьер Шоттки и межфазный слой, которые обычно приводят к изменениям в проводимости, рабочей функции и диэлектрической проницаемости. Мы также освещаем пользу, технические проблемы с соответствующими решениями современных гибких сенсоров и обсуждаем потенциальные стратегии для преодоления ограничений в потреблении энергии, количественном определении плюсов и минусов в поддержании качества и потребительских свойств, оптимизации беспроводной связи и изучения новых сенсорных паттернов.

1. Introduction

1.1. How important is food safety?

The World Health Organization (WHO) pointed out [1] that contaminated food is responsible for causing an estimated 600 million people fall ill globally, resulting in 420,000 deaths each year [1]. Over the past few years, the increasing awareness among consumers about a healthy lifestyle has sharply raised their familiarity towards food quality and safety [2]. Food quality is a reliable indicator that relates to the consumption needs and expectations of consumers. Common food quality includes factors such as freshness, texture, ingredients, grading of physical appearance and so on. It can lead to taste, health, safety, and pleasure [3]. Food products with high quality are always expected and demanded by consumers [4]. Food safety problems typically include chemical pollution, microbial pollution, and physical pollution [2]. Bacteria, viruses, parasites

and fungi existing in the environment may cause diseases of consumers, and they can also easily contaminate the consumable food materials [5]. During the past decades, pesticides have been widely used for high yield productions [6], while the increasing usage of various pesticides can lead to high levels of residues in foodstuff and accumulation in the food chain, which poses a huge threat to human health [7,8].

1.2. What are the key concerns in food monitoring?

With the globalization of economy and trade, and the rapid circulation of various food products around the world, potential food contamination, and fraudulent food manufacturing have prompted consumers to pay more attention to the quality and safety of their food [9]. All this has generated the urge to develop food monitoring systems that can control and prevent food-borne illnesses, ensure consumer health and

FOR CITATION: Luo, D., Nikitina, M. A., Xiao, X. (2023). Flexible sensors for food monitoring. Part I: Principle. *Food Systems*, 6(4), 519-530. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-519-530>

Для ЦИТИРОВАНИЯ: Люо, Д., Никитина, М.А., Сяо, С. (2023). Гибкие сенсоры для мониторинга пищевых продуктов: часть 1 — принцип. *Пищевые системы*, 6(4), 519-530. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-519-530>

safety, and promote the development of the food industry. In recent years, significant progress has been made in food quality and safety monitoring based on traditional laboratory analysis and rigid sensor detection. Food quality detection involves measuring various parameters such as temperature [10], humidity [11], pH [12], flavor [13], multi-gas [14] and freshness marking [15]. On the other hand, food safety monitoring involves detecting microorganisms [16], pesticides [17], illegal additives malachite green [18], melamine [19], antibiotic residues [20] and so on. However, traditional rigid sensors exhibit several challenges in food monitoring. First, the intrinsic mechanical non-conformability property of rigid sensors makes them difficult to adapt to arbitrarily curved surfaces and shape changeable parts (or movable parts). Secondly, rigid sensors are large, unbendable, and heavy, which makes effective integration with detection targets difficult. Thirdly, rigid sensors may not maintain consistent contact, resulting in inaccurate or unreliable data collection. Finally, manufacturing process of rigid sensors is extremely complex and contaminated, and they cannot be manufactured in individualized and small batches [21,22].

1.3. Flexible sensing have emerged as a prominent technological advancement in the realm of flexible electronics

Compared to conventional rigid sensors, flexible sensors play a crucial role in the application of flexible electronics, which possess unique advantages such as light weight, portability, great flexibility, stretchability, foldability, and adaptability [23–25]. Flexible electronics refers to circuits and electronic components that can retain their functions under circumstances of bending or stretching [26–28]. The concept of flexible electronics was introduced in the 1960s when copper was patterned on polyimide, resulting in a reduction in the thickness of the solar cell from 400 to 100 μm and leading to an unprecedented leap forward in power density [29–31]. Ever since then, innovations in materials with greater flexibility and large processability, such as conductive polymers [32–34], organic semiconductors [35,36], and amorphous silicon [37,38], have gradually laid the foundation for flexible electronics. With the rapid development of material science, flexible electronics have recently ridden the wave of carbon nanotubes [39,40], graphene platelets [41,42], precious metal nanomaterials (e. g., silver NWs, platinum NPs, etc.) [43,44,45], nanohybrid materials (e. g., CNT-PDMS composites) [46] and even optically transparent hydrogels [24], which brings high sensitivity, fast response, low power consumption, and long lifespan to flexible sensors. With the unique characteristics such as ultrathin, low modulus, light weight, high flexibility, and stretchability [47], flexible sensors precisely meet the needs in food monitoring: acquiring multi-parameter information in a small space, a more reasonable layout, providing data on packaging deformation [48], and conformably attaching to the surface of the skin [47]. Simultaneously, the new generation of information technology represented by wearable Internet of Things (W-IoT) [49], blockchain [50] and cloud computing, have generated immense interest for the nascent flexible sensing because it can integrate and connect personnel, processes, data, and equipment enabling the high adaptability [51], high precision, multiple scale, dynamic non-destructive monitoring [49]. Flexible sensing in food monitoring has become increasingly significant in recent years [44,52,54,55], and is rapidly evolving in its application scenarios [44,48,52,53,54,55], and manufacturing methodology [44,53]. The synergy between flexible sensing and developments in material science [26–46] and microfabrication technology has been instrumental in the success of both fields with innovations in one driving progress and in the other.

In this review, we systematically discuss the configurations, sensing mechanisms, and application of flexible sensors in food monitoring. First, we summarize the basic architecture regarding flexible substrates, conductive electrodes, and sensing materials focusing on the unique properties (e. g., mechanical, electrical, chemical properties, etc.) of materials and the fabrication techniques. Secondly, we elaborate the sensing mechanisms and transduction mechanisms of several typical transducers (i. e., resistor, electrochemical sensor, and capacitor). Thirdly, we comprehensively discuss the applications of flexible sensors in the categories of physical, chemical, and biological aspects. Finally, we provide an overview of the benefits and technical challenges of current flexible sensors, and highlight the potential strategies to improve the performance of state-of-the-art flexible food monitoring sensors.

2. Principle of food monitoring flexible sensors

To understand why sensitive detection of physical perturbations, chemical analytes, and microbes can be realized in flexible sensors, and how sensing materials work (e. g., resistive [58], capacitive [59], piezoelectric [44,60], potentiometric [61], amperometric [62,63], impedimetric [63] sensors, etc.), it is necessary to know the physics behind. A typical flexible

food monitoring sensor contains a flexible substrate, and two functional components: a conductive interconnect/electrode [64,65,66,67] (hereinafter referred to as “conductive electrode”) which connect the transducer and the output interface of data and an active sensing material-equipped flexible transducer (i. e., transducing the concentration of analytes or a physical perturbation, such as temperature, into an electrical signal). In this section, we will systematically introduce the configurations, materials, and working mechanisms of flexible sensors for food monitoring.

2.1. Flexible substrates

Flexible sensors have intrinsic characteristics including the ability to bend [44,51–55], fold [51,55], stretch [68,69,70,71], twist [72], and even self-heal [56,73] if damaged. Flexible substrates are the main contributor to the deformation dynamics of the sensors. Conventional rigid substrates such as silicon [74], plastic [75], Al_2O_3 [76], etc., have the advantages of simple structure, convenient preparation and reliable responsiveness. However, the rigidity hinders the capture of analytes and results in poor signal transduction [77], which limits the performance of conventional sensors. Flexible food monitoring sensors, whether attached to the living organisms’ surfaces [44,52,55,78] or integrated inside or outside of packaging [58], need to be lightweight, small, and easy to use [67]. Flexible substrates, taking polymers as an example, are intrinsically or molecularly stretchable materials, which use the materials themselves to accommodate strain [79]. At the molecular level, mechanical softness can be determined by two classifications: tailoring of the chemical structure (e. g., the lengths and composition of the side chains and rigidity of the backbones) and tuning properties familiar to the polymer engineering community (e. g., molecular weight, polydispersity, and cross-linking) [80]. The use of flexible substrates can greatly enhance the functionality, durability, and versatility of flexible devices, making them ideal for use in food monitoring. Among various materials used as substrates for flexible sensors in food monitoring, polymers [51,58,81,82] dominate as the most commonly employed base material, with a few exceptions using materials such as paper [83], carbon paper [84], carbon cloth [84], and others [74]. In this section, we will discuss several typical types of polymer substrates and paper-based substrates. Although paper and carbon-paper substrates are infrequently used as substrate materials, we will introduce them together in the same section to provide an overview of their potential use.

2.2. Polymer substrates

In food monitoring, polymers represent the predominant substrate material for flexible sensors, accounting for a significant majority of their composition. In addition to high flexibility, adaptability and low cost, polymer substrates offer a range of unique advantages for flexible sensor components, including biocompatibility (e. g., PEDOT: PSS, HPU, PLA, PDMS, PET, etc.) [63,85,86,87], elasticity (e. g., PDMS, PEDOT: PSS, HPU, rubber, etc.) [44,58,63,88], and intrinsic stretchability (e. g., PEDOT: PSS, PDMS, HPU, rubber, nitrile, etc.) [44,89,90]. Biocompatibility is highly advantageous for direct contact measurements between sensors and living organisms; elasticity and intrinsic stretchability allow sensors to adapt to irregular deformations of the analytes’ surfaces, obtaining more reliable data. The polymers used for flexible substrates can be classified into the following categories based on their chemical structure and properties: (1) polyimide: PI (polyimide) [51,81,91]; (2) polyester: PET (polyethylene terephthalate) [59,92], PEN (polyethylene naphthalate) [93]; (3) polysiloxane: PDMS (polydimethylsiloxane) [44,58]; (4) biodegradable: PLA (polylactic acid) [87]; (5) rubber: rubber [88], nitrile (nitrile rubber) [89,90]; (6) polyurethane: HPU (hydrophilic polyurethane) [63]; (7) epoxy: epoxy (epoxy resin) [82]; (8) polyethylene: PE (polyethylene) [82], PVC (polyvinyl chloride) [58], OPP (oriented polypropylene) [62]. Herein, we will discuss several typical polymers regarding their physical, chemical, and possibly biological properties.

Polyimide (PI): In the polymer family, polyimide (PI) has some notable properties. For example, PI is a high-temperature resistant polymer, with excellent mechanical and electrical properties. In the field of laser direct scribing for flexible PCB [53,58,81], PI is a commonly preferred substrate material due to its favorable properties. Xiao and his team [51] proposed and developed a flexible battery-free wireless electronic system (FBES) for food monitoring. The FBES was fabricated by laser direct scribing on commercial PET/PI/Cu film. PI also has good chemical resistance and can withstand exposure to many solvents and chemicals. Schöning et al. [94] developed calorimetric gas sensors on PI films for more precise detection of gaseous H_2O_2 over a wide H_2O_2 concentration range. In addition, the nature of the PI chemical repeat units plays a key role in the fabrication of LDG electrodes [95]. Ever since it was first discovered in 2004 by Geim and Novoselov, graphene has garnered significant attention from the scientific community owing to its unparalleled properties [96,97,98].

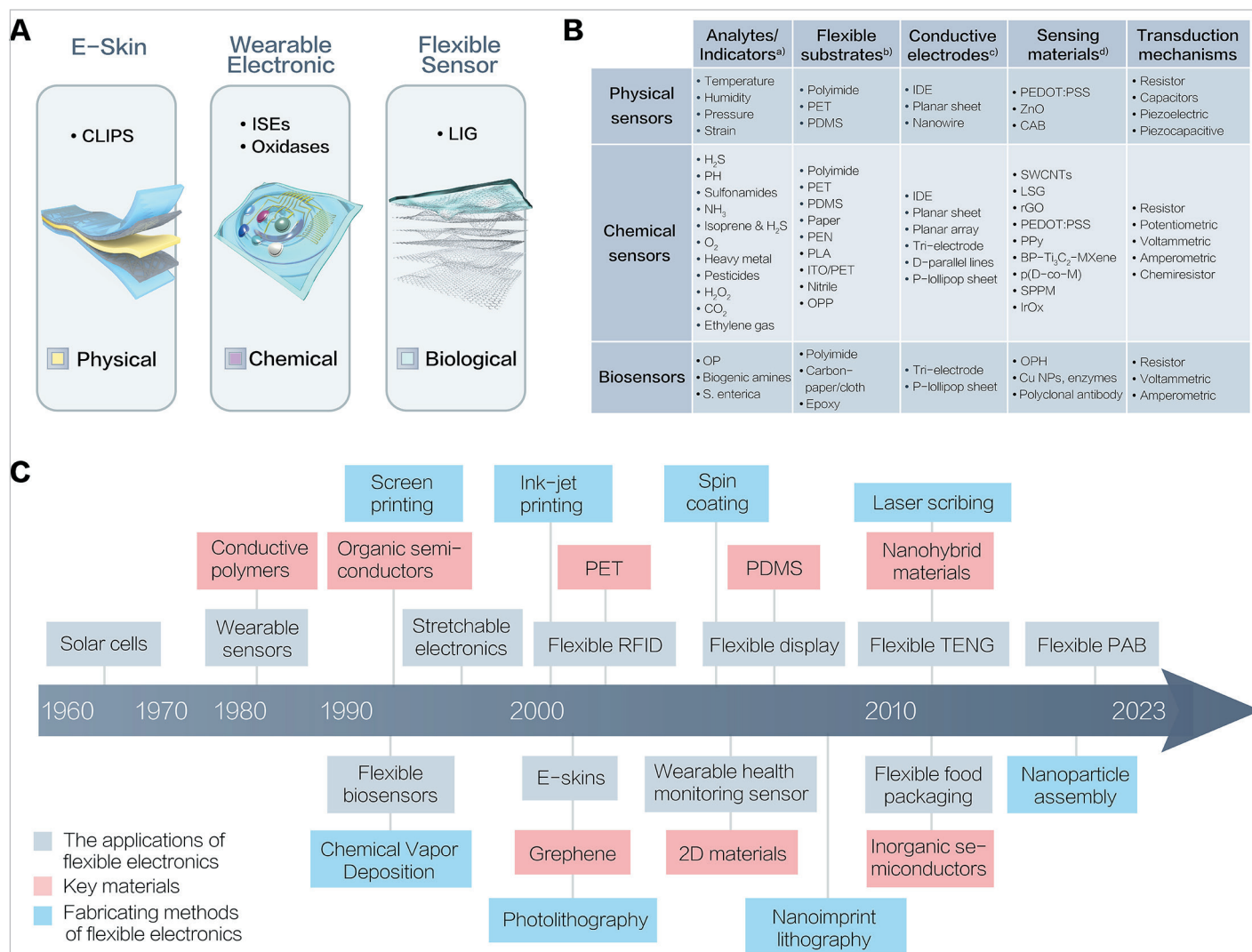


Figure 1. Flexible sensors application architecture. (A) Three typical categories of flexible electronics using physical, chemical, and biological sensing mechanism, respectively. E-Skin: Adapted with permission [56]. Copyright 2022, Nature Publishing Group. CLIPS: Cl-functionalized iontronic pressure sensitive material. Wearable electronics: Adapted with permission [57]. Copyright 2016, Nature Publishing Group. ISEs: Ion-selective electrodes. Flexible sensor: The PI film was patterned using laser scribing to obtain 3D porous LIG. Then, liquid PDMS was drop-casted and heated for a specific period of time. Finally, the side of PDMS/LIG was peeled off to obtain the stretchable LIG-based electrode. LIG: Laser induced graphene. (B) Summary of monitoring indicators, materials, transduction mechanisms, etc., of three types of flexible sensors (i. e., physical, chemical, and biological) used for food monitoring. (a) OP: Organophosphate. (b) PET: Polyethylene terephthalate, PDMS: Polydimethylsiloxane, PEN: Polyethylene naphthalate, PLA: Polylactic acid, ITO: Indium Tin Oxide, OPP: Oriented polypropylene. (c) IDE: Interdigitated electrodes, Tri-electrode: three electrode system, D-parallel lines: Double parallel lines, P-lollipop sheet: This is a new definition here that refers to a flat shape resembling a lollipop. (d) PEDOT: PSS: Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate, CAB: Cellulose acetate butyrate, SWCNTs: Single-walled carbon nanotubes, LSG: Laser scribed graphene, rGO: Reduced graphene oxide, PPy: Polypyrrole, BP-Ti₃C₂-MXene: Two-dimensional phosphorene (BP) nanohybrid with graphene-like titanium carbide MXene (MXene, 2D material, can be synthesized by etching “A” from MAX phase (“M” represents transition metals, “A” represents group IIIA/IVA elements and “X” represents C and/or N elements)), p(D-co-M): poly(N-[3-(dimethylamino)propyl]-methacrylamide-co-2-N-morpholinoethyl methacrylate), SPPM: SWCNT-PdNP-polystyrene microsphere, IrOx: Iridium oxide, OPH: Organophosphorus hydrolase, NPs: Nanoparticles. (C) Timeline of major events in flexible electronics development. PAB: Polyclonal antibody biosensor, TENG: Triboelectric nanogenerator.

Рисунок 1. Архитектура применения гибких сенсоров. (А) Три типичных категории гибкой электроники с использованием физического, химического и биологического сенсорного механизма, соответственно. Электронная кожа (E-Skin): адаптировано с разрешения [56]. Copyright 2022, Nature Publishing Group. CLIPS: Cl-функционализированный ионотронный чувствительный к давлению материал. Носимая электроника: адаптировано с разрешения [57]. Copyright 2016, Nature Publishing Group. ISEs: ионоселективные электроды. Гибкий сенсор: Пленка PI была структурирована, используя лазерное скрайбирование для получения 3D пористого LIG. Затем был нанесен жидкий PDMS методом литья каплями и нагрет в течение определенного периода времени. Наконец, была отделена сторона PDMS/LIG для получения растяжимого электрода на основе LIG. LIG: лазерно-индуцированный графен. (В) Краткое представление мониторинговых индикаторов, материалов, механизмов преобразования и т. д. трёх типов гибких сенсоров (т. е., физический, химический и биологический), используемые для мониторинга пищевых продуктов (а) ОР: органофосфат. (б) PET: полиэтилентерефталат, PDMS: полидиметилсилоксан, PEN: полиэтиленнафталат, PLA: полимолочная кислота, ITO: Оксид индия-олова, OPP: ориентированный полипропилен. (с) IDE: гребенчатые электроды, Tri-electrode: трех электродная система, D-parallel lines: двойные параллельные линии, P-lollipop sheet: Это новое определение здесь, которое относится к плоской форме, напоминающей леденец на палочке. (д) PEDOT: PSS: поли(3,4-этилендиокситиофен) полистиролсульфонат, CAB: ацетобутират целлюлозы, SWCNTs: одностенные углеродные нанотрубки, LSG: лазерно-скрайбированный графен, rGO: восстановленный оксид графена, PPy: полипиррол, BP-Ti₃C₂-MXene: наногибрид двумерного фосфорена (BP) с графено-подобным карбидом титана MXene (MXene, 2D материал, может быть синтезирован путём травления “А” из фазы MAX (“М” представляет собой переходные металлы, “А” представляет собой группу элементов IIIA/IVA и “X” представляет собой С и/или N элементы)), p(D-co-M): поли(N-[3-(диметиламино)пропил]-метакриламид-ко-2-N-морфолиноэтил метакрилат), SPPM: SWCNT-PdNP-полистироловая микросфера, IrOx: оксид иридия, OPH: фосфорорганическая гидролаза, NPs: наночастицы. (С) временная шкала основных событий в разработке гибкой электроники. PAB: биосенсор поликлональных антител, TENG: трибоэлектрический наногенератор

Gomes et al. [99] developed an impedimetric immunosensor based on LIG electrodes functionalized with specific antibodies for the detection of *Salmonella enterica* using laser-induced porous graphene produced from PI, showing potential in the sensing field.

Polyethylene terephthalate (PET): PET has gained widespread popularity as a platform for food monitoring sensors, owing to its excellent mechanical properties (i. e. bendability, durability, etc.) [100], low cost, commercial availability [59], and outstanding adhesion with nanowires (mixed with PDMS, ZnO, etc.) [100] and functional ink materials (silver-nanoparticles ink) [59]. Duan et al. [100] developed a flexible ammonia sensor with highly aligned conducting polymer nanowires fabricated by a capillary filling-based soft lithography technique on a PET substrate. Owing to the PET substrate's superior mechanical stability and adhesion ability to nanowires, after 1200 bending cycles, no physical damage to the sensing material (flexible nanowire) was caused by mechanical fatigue failure of the substrate, which could have resulted in unfavorable resistance changes of a sensor. Rooij et al. [59] developed humidity sensors equipped with planar interdigitated electrodes (IDE) capacitors. The extraordinary adhesion between silver ink and PET substrate permitted the growth of thicker (up to 15 μm) layers of Ni on substrate. However, PET substrates are unsuitable for stretchable sensing platforms due to their relatively higher tensile strength (2–4 GPa) [65,67], and high temperature (>100 °C) [101] material processing is not possible on it because of less thermal stability.

Polydimethylsiloxane (PDMS): PDMS is a commonly used flexible substrate material of flexible sensors for food monitoring due to its unique mechanical properties [102], remarkable transparency (under visible spectrum) [58], extraordinary biocompatibility, and resistance against chemicals such as water and the majority of alcohols and bases [58]. Escobedo et al. [58] fabricated a smart strain tag through injecting an active material into a microchannel made from PDMS. This flexible strain sensor exhibited a considerably good performance with an average gauge factor of up to 13000, and an average degree of hysteresis (DH) within the range of < 9%. PDMS was also applied as a protective layer for flexible PCB (preventing the oxidation of the Cu circuit) [51] and NFC tag (encapsulating and protecting against moisture, liquid, etc.) [58]. Xia et al. [44] fabricated a flexible dual-mechanism pressure sensor, where PDMS was employed as the substrate due to its exceptional elasticity, as well as the cross-linking matrix due to its chemical stability and low relative permittivity. This sensor demonstrates a long-term stability of over 5000 pressure cycles and exhibits satisfactory linearity, repeatability, and stability when detecting pressures in the range of 0–100 kPa.

2.3. Paper-based substrates

Just like the knight Edgar, who has fewer appearances but is essential in Shakespeare's King Lear, paper-based substrates also play a crucial role in the fabrication of flexible food monitoring sensors. Paper-based substrates possess excellent properties including flexibility [109], breathability [66], hygroscopy [110], ionic conductivity modulation [110] and easily forming cross-linked structure with nanosized sensing materials [83], which makes them ideal for use as a lightweight, low-cost, recyclable, biocompatible starting substrate [83,111]. Tang et al. [83] designed a paper-supported H_2S sensing electrode through loading Cu_2O -polypyrrole conductive aerogel (Cu_2O -PPy). The flexible electrode exhibits excellent H_2S sensing and egg spoilage monitoring performance owing to the synergistic effect between the different components and 3D porous architecture. Padalkar et al. [84] developed a ZnO-based biosensor on flexible and porous carbon paper/ cloth to detect organophosphates (e. g. paraoxon). Due to the three-dimensional substrate and the morphology of the nanomaterials, the path length for charge carriers was significantly reduced, leading to a decrease in recombination losses and an increase in electrical

conductivity. As a result, the device exhibited higher sensitivity and lower LOD values. Table 1 summarizes the mechanical, physicochemical and thermal properties of the four most used materials of substrates in fabrication of food monitoring sensors [104,105].

2.4. Conductive electrodes

Conductive electrodes play a crucial role in the fabrication of flexible sensors [67,118]. The function of the conductive electrode is to collect electrical signals from the sensor and transmit them to a processor or other circuit for analysis and processing. They are usually made of conductive materials such as metal nanoparticles/nanowires (i. e. Au [100,113], Ag [58], Ni [59], etc.), conductive ink compound (e. g., Ag/Cl ink, carbon ink, etc.) [114], conductive polymer (e. g. PEDOT: PSS [63], polypyrrole [83], etc.), laser-derived graphene (LDG) [91,99], graphene-carboxymethyl cellulose(G-CMC) [119], etc. The design and fabrication of conductive electrodes have a significant impact on the performance and sensitivity of sensors.

The fabrication of conductive electrodes and device arrays have been investigated via three different approaches:

1. flexible electrodes were fabricated with a micrometer-scale thickness [59] using non-stretchable materials such as metal [58,100,113], polymer [91,99], and paper [83] through various processing techniques including inkjet printing [59], screen printing [87], laser irradiation [92], photolithography [113], etc.;
2. stretchable electrodes were obtained by intrinsically stretchable materials (e. g. PEDOT: PSS [63] and polypyrrole [83]);
3. stretchable electrodes were developed through i) geometric engineering of non-stretchable but flexible materials and ii) mixing conductive ink with intrinsically stretchable polymers such as silicone elastomer and polystyrene-block-polyisoprene-block-polystyrene (PS-PI-PS) [90].

Molina-Lopez et al. [59] developed a functional humidity sensor with planar interdigitated electrodes (IDE) using an all-additive approach. They achieved this by ink-jetting the silver nanoparticle ink onto a PET substrate and electrodepositioning nickel on silver with nickel thickness ranging from a few hundred nanometers to 15 μm on PET. High sensor stability was obtained by passivating printed silver electrodes with nickel. This prevented silver from oxidizing or releasing any possible trapped organic residue after interacting with humidity, and also provided extra stiffness to reduce strains on the electrode plane. Escobedo et al. [58] fabricated a strain sensing tag by injecting intrinsically stretchable conductive polymer PEDOT: PSS into the microchannel shaped by a copper mold in a PDMS substrate. Mishra et al. [90] designed a wearable organophosphorus (OP) glove biosensor via printing Ag/AgCl and carbon-based serpentine structures on the glove. This excellent geometric structural design allows the electrode to withstand extreme mechanical deformations while detecting organophosphate (OP) nerve-agent compounds on suspicious surfaces and agricultural products. Table 2 summarizes the materials, fabricating methods and geometry forms of conductive electrodes in fabrication of flexible sensors for food monitoring.

3. Flexible sensing materials

Flexible sensors require the integration of various crucial components, including sensing materials that can be incorporated within or stacked onto flexible substrates [120]. Sensing materials play a vital role in the performance of flexible devices [67], enabling them to detect and respond to stimulation of analytes or physical perturbation. The electrical and physicochemical properties of sensing materials determine the sensitivity, stability, and selectivity of the sensors. Therefore, the development and incorporation of advanced sensing materials are essential for the fabrication of flexible sensors. Conventional sensing

Table 1. Summary of the mechanical, physicochemical and thermal properties of typical flexible substrates used in food monitoring sensors

Таблица 1. Краткое представление механических, физико-химических и термических свойств типичных гибких субстратов, используемых в сенсорах для мониторинга пищевых продуктов

Materials ^{a)}	Flexibility/ Stretchability	Young's modulus [MPa]	Tensile strength [MPa]	Thermal stability / Coefficient of thermal expansion [K ⁻¹]	Chemical resistance	Transparency	Ref.
PI	Flexible	2–3 × 10 ⁵	70–150	Resist temperature (<450 °C) 3–6 × 10 ⁻⁵	Weak acids, alkali	Low	[101,103, 104,105]
PET	Flexible	2–4 × 10 ⁵	80	Resist temperature (<100 °C) 2–8 × 10 ⁻⁵	Dissolvable in acetone	High (>85%)	[101,103, 104,105]
PDMS	Stretchable	1.8 ^{b)}	6.7 ^{b)}	Resist temperature (<100 °C) 30–31 × 10 ⁻⁵	Ethanol and acetone	High (>95%)	[106,107]
Paper	Flexible	2.1–2.8 × 10 ⁵	40–60	Resist temperature (<100 °C) 0.2–1.6 × 10 ⁻⁵	No	No	[101,108]

^{a)} PI: polyimide; PET: polyethylene terephthalate; PDMS: polydimethylsiloxane; ^{b)} SYLGARD184 silicone elastomer.

Table 2. **Materials, fabricating methods and geometry forms of conductive electrodes in fabrication of food monitoring sensors**
 Таблица 2. Материалы, методы изготовления и геометрические формы проводящих электродов при изготовлении сенсоров для мониторинга пищевых продуктов

Analytes/Monitoring indicators ^{a)}	Materials ^{b)}	Methods of fabrication ^{c)}	Geometry forms ^{d)}	Ref.
Temperature	Silver conductive paste	Stencil printing	Planar serpentine structures	[58]
Humidity	Ag NPs ink Ni	Inkjet printing Electroplating	IDE	[59]
Pressure	PDMS Ag NWs	Spinning coating Drop-casting	Planar sheet	[44]
Strain	PEDOT: PSS	Injecting	Nanowire	[58]
H ₂ S	Cu	Commercial Cu foil	Planar sheet	[83]
PH	Au, Cr IrOx Ag/AgCl	e-beam evaporation Sol-gel process Electroplating	Planar double electrode system	[81]
	ITO	Laser exfoliating and Evaporating patterning	Planar lollipop sheet	[61]
	PDDA-IrOx	LbL IJP and alternate deposition	Planar sheet	[60]
Sulfonamides	LIPG	Laser scribing	Three-electrode system	[112]
NH ₃	Au	Evaporating through copper shadow mask	IDE	[100]
Isoprene and H ₂ S	ITO Au	Photolithography Magnetron sputtering	IDE	[113]
O ₂	Ag-OPP cathode Zinc anode	Commercial available silver-deposited OPP film Commercial available zinc film	Planar sheet	[62]
Heavy metal	Ag/Cl conductive ink Carbon conductive ink	Printing	Planar array	[114]
Pesticides	Carbon ink Ag/AgCl	Screen printing Coating	Three-electrode system	[87]
	LIPG	Laser scribing	Three-electrode system	[115]
	Carbon ink and CSS/PCBN	Screen printing and drop-casting	Three-electrode system	[88]
	ZnO nanostructures and Ag/AgCl	Electrodepositing	Three-electrode system	[84]
H ₂ O ₂	PEDOT: PSS/HPU/HRP	Screen printing	Three-electrode system	[63]
	LSG Ag/AgCl	Laser irradiation Electrodeposition	Three-electrode system	[92]
CO ₂	Carbon black	Printing	Planar double parallel lines	[116]
Ethylene gas	Gold foil	Laser direct writing	IDE	[117]
OP	Ecoflex, carbon ink, and PS-PI-PS	Screen printing	Three-electrode system with serpentine structures	[90]
Biogenic amines	LSG	Laser scribing	Three-electrode system with	[91]
Salmonella enterica	LSG	Laser scribing	Planar lollipop sheet	[99]

^{a)} OP: Organophosphate.

^{b)} Ag NPs: Ag nanoparticles, Ni: Nickel, PDMS: Polydimethylsiloxane, Ag NWs: Ag nanowires, PEDOT: PSS: Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate, IrOx: Iridium oxide, ITO: Indium Tin Oxide, PDDA: Polydiallyldimethylammonium, LIPG: Laser induced porous graphene, OPP: Oriented polypropylene, CSS: Carbon spherical shells, PCBN: Printex carbon nanoballs, HPU: Hydrophilic polyurethane, HRP: Horseradish peroxidase, LSG: Laser scribed graphene, Ecoflex: Ag/AgCl ink with platinum-catalyzed silicone elastomer, PS-PI-PS: Polystyrene-block-polyisoprene-block-polystyrene.

^{c)} LbL IJP: Layer-by-layer inkjet printing.

^{d)} IDE: Interdigitated electrodes, Planar lollipop sheet: This is a new definition here that refers to a flat shape resembling a lollipop, formed by a combination of a circle and a rectangle.

materials are modular, generally semiconducting and conducting inherently, changing their electrical properties upon exposure to various application scenarios [67]. Although their electronic performance exhibits high carrier mobility and stability, compared to novel nanomaterials such as conductive polymers, they show weaknesses in physical and chemical properties: high Young's modulus, poor controllability and tunability of chemical composition and molecular structure [120]. The sensing materials need to be lightweight, low-cost, and well compatible with large scale processing [67]. With advancement in nanotechnology, carbon nanomaterials [67,121], conductive polymers [122], nanohybrid materials, metal nanomaterials (e. g., AuNPs, BiNPs, etc.) [114] have been demonstrated to be promising sensing materials in flexible electronics applications. Numerous materials such as laser-scribed/induced graphene (LSG/LIG) [92,95,99,123,124,125], laser-induced porous graphene (LIPG) [112,115], graphene-CMC (carboxymethyl cellulose) [119], SWCNT-PdNP-polystyrene microsphere (SPPM) [117], carbon spherical shells (CSS) [88], CuxO-PPy@GO aerogel [83], PEDOT: PSS [44,58,126,126,128], poly(N-[3-(dimethylamino)propyl]-methacrylamide-co-2-N-morpholinoethyl methacrylate) (p(D-co-M)) [116], Ti3C2-MXene/BP nanohybrid [112], AuNPs [114], iridium oxide (IrOx) nanoparticles [60], etc., have exhibited remarkable performance in various research settings. In this section, we focus on three categories of nanomaterials: carbon nanomaterials, conductive polymers, and

nanohybrid materials. The electrical, physical, mechanical, and chemical properties, fabrication methods, and sensing mechanisms of sensing materials are explained.

3.1. Carbon nanomaterials

The unique electronic, mechanical, and chemical properties of carbon nanomaterials make them very interesting for developing the new generation of miniaturized, low-power, ubiquitous sensors [121,129]. Low-dimensional carbon structures, with the majority of their atoms exposed to the surroundings, provide a large specific surface area that can be advantageous in achieving high sensitivity [121,130]. In the last few years, nanomaterials like carbon spherical shells (CSS), single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), laser-scribed graphene (LSG), laser-induced porous graphene (LIPG), laser-scribed graphene oxide (LSGO), reduced graphene oxide (rGO), etc., have become the most studied carbon-based materials for developing food monitoring sensors. In this part, we will discuss two types carbon-based nanomaterials systematically.

Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs): After their discovery in 1991 by Iijima and Ichihashi, carbon nanotubes (CNTs) have been extensively researched for their unique electrical, physical, mechanical, and chemical properties in the development of high-performance sensing devices [131]. Sensors equipped with SWCNTs exhibit reversible stretchability, fast response and substantially higher sensitivity at

room temperature [66,132], owing to their high carrier mobility, excellent physical properties, ease of modification, and sizeable surface-area-to-volume ratio, which provides a huge number of active sites for analytes [133,134,135,136]. Yan et al. [117] developed a flexible paper-based chemoresistive sensor by modifying a SWCNT-PdNP-polystyrene microsphere (SPPM) composite (SPPM/FWPCS) for the low-cost and online detection of C_2H_4 from banana. SWCNT-PdNP-PM composites were synthesized by a method of self-assembly under van der Waals forces, and then was pipetted on the sensing area of the interdigitated electrodes and dried at room temperature. The sensing mechanism involves the release of trapped electrons due to the oxidation and cleavage of ethylene, resulting in a decrease in resistance. More specifically, the Schottky barriers between SWCNTs, PdNPs, and adsorbed oxygen in the sensing composite create an electron depletion layer, and adsorbed oxygen (O_2^-) is formed during the process. The concentration of C_2H_4 can be detected down to 100 ppb (subppm level). The detection range of a rigid sensor is the total amount of ethylene in the entire space, which, coupled with diffusivity of gases, leads to hysteresis for the monitoring of fruit ripeness and corruption. Flexible sensors can be used to overcome this limitation by placing them inside fruit packaging.

Laser-scribed graphene (LSG): The discovery of graphene in 2004 by Geim and Novoselov generated great scientific interest because of its excellent properties [137–141], including rapid electron mobility, self-assembly behavior, excellent conductivity, large specific surface area, high mechanical strength and stability, etc. [141–149]. Graphene is a single layer of sp^2 -hybridized carbon atoms covalently bound together in a honeycomb lattice [140]. First, its outstanding electronic properties, such as high carrier mobility and high carrier density, make it a promising candidate for fabricating high-performance electrically-transduced analytical devices [64,148]. Secondly, the surface properties of graphene enable it to interact with a wide range of analytes through different mechanisms such as van der Waals forces, electron transfer, or covalent bonding [140,149], which can lead to changes in the conductivity of the sensing layer. Thirdly, graphene's high surface-to-volume ratio implies that each carbon atom in graphene functions as a surface atom, resulting in the maximum possible surface area per unit volume. As a result, the charge transport in graphene is extremely sensitive to its chemical surroundings [149,150]. Fourthly, flexible electronic devices often undergo mechanical stress and deformation during operation, so they require materials that can withstand these stresses without breaking or losing their functionality. Graphene, which has high mechanical strength and stability, is therefore a promising material for use in flexible electronic devices. By using graphene as a base material, flexible electronics can be designed with improved durability and reliability, even under harsh operating conditions [146,151]. Traditional methods for producing graphene, such as thermal decomposition [152,153], mechanical exfoliation [154,155], and chemical vapor deposition (CVD) [156,157] are time-consuming and complex. In contrast, laser-derived graphene (LDG) technology offers an easy, mask-free, and low-cost alternative for the production of graphene-based materials. The products are now mainly termed laser-scribed graphene (LSG) or laser-induced graphene (LIG), etc. [95]. Aparicio-Martínez et al. [92] developed a novel, flexible and non-enzymatic electrochemical H_2O_2 sensor based on a laser-scribed graphene (LSG) electrode decorated with silver nanoparticles (LSG-Ag). They fabricated a graphene electrode on a PET substrate that was coated with GO, using a 780 nm 5 mW infrared laser from a DVD unit. And then, they decorated the LSG electrode with silver nanoparticles (LSG-Ag). The changes in morphology caused by the laser treatment, such as increased roughness, expansion, surface defects, and exposure of edge planes, have a significant impact on the electrochemical performance of the material [123,158,159]. Specifically, during silver electrodeposition, defects and features of LSG acted as nucleation sites and induced a high density of non-spherical nanoparticles (sizes from 70 to 120 nm) with uniform distribution over the LSG layers. The sensing mechanism of this amperometric sensor can be described as follows: the sensing material's role is to interact with the analyte through the active sites on its surface, while the electrode is maintained at a fixed potential and the cathode current is monitored over time. The cathode current magnitude is related to the concentration of the analyte present. The morphology features of LSG such as 3D architecture, surface defects, exfoliation, edge plane exposure and oxygen removal were combined with the electrocatalytic activity of AgNPs, resulting in an overall enhanced non-enzymatic H_2O_2 detection. The LSG-Ag sensor demonstrated low LOD of 7.9 μM , rapid amperometric response within 3 seconds, as well as high repeatability of 3% R.S.D. and reproducibility of 4.5% R.S.D. It also showed minimal loss of performance even after continuous bending.

3.2. Conductive polymers

Conductive polymers (CPs) have been acknowledged as a distinctive category of organic materials possessing exclusive electrical and optical characteristics comparable to those of inorganic semiconductors and metals [160]. CPs can be synthesized through simple, versatile, and cost-effective methods. Furthermore, they can be easily assembled into supramolecular structures with multifunctional capabilities through electropolymerization processes [161]. The development of various methodologies has enabled the modification and tuning of CPs to incorporate them into the fabrication of stretchable sensors, which include both physical and electrochemical sensors. Such novel innovations are highly desired and sought after in various fields of flexible sensing, including temperature monitoring, strain sensing, and the high-sensitivity active gas sensing (e. g., H_2S), as they hold the potential to pave the way for future breakthroughs. Conjugated π polymers are a class of materials with electrons held in their backbones [162], such as poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and polypyrrole (PPy). The unsaturated backbone of conductive polymers allows for the delocalization of π -electrons, which facilitates the movement of charge carriers along an electrical pathway [163,164]. Flexible sensing materials that incorporate CPs exhibit RT-sensing capabilities and ease of chemical modification. Specifically, the high flexibility of polymeric materials enables the sensing materials to be easily deposited or patterned onto flexible or stretchable substrates, and they can withstand mechanical deformation during use, thus maintaining the integrity of the sensing layer [67]. As typical examples of conductive polymers, PEDOT: PSS and polypyrrole (PPy) will be discussed here.

Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate (PEDOT: PSS): polythiophene is a fascinating material due to its persistent conductivity and impressive electrical conductivity ($10^3 S cm^{-1}$), which is influenced by the dopant and polymerization type [165,167,167]. PEDOT can be polymerized through electrochemical or oxidative chemical methods, and it is a polymer with high electrical conductivity [160]. Compared to PPy, PEDOT possesses superior chemical [168–170] and thermal [170] stability and has been postulated for possible use as an interfacing agent [160]. PEDOT can be hybridized with poly(styrenesulfonate) (PSS) to improve electrical conductivity [171]. PSS was used for doping the PEDOT for film fabrication by spin coating and vapor phase polymerization [160]. The conductivity mechanism of PEDOT: PSS is based on the synergistic effect between PEDOT and PSS, where PEDOT serves as the conductive backbone providing the pathway for electron transfer, while PSS acts as the electrolyte stabilizing the polymer chains of PEDOT and regulating the conductivity. The highly ordered hybridization between PEDOT and PSS results in PEDOT: PSS composite materials with high conductivity. Conductive polymers are a popular choice for temperature sensing due to their ease of processing and excellent electrical properties, although they may be unstable at high temperatures [172]. However, PEDOT: PSS stands out as one of the most stable organic conductive polymers with electrical properties similar to those of a metal or semiconductor [173,174]. Escobedo et al. [58] designed a temperature sensing tag by printing silver electrodes on a flexible polyvinyl chloride (PVC) substrate and then drop-casting PEDOT: PSS on silver electrodes with a gap of 2 mm. With an increase in temperature, the mobility of carriers within the sensing layer is predicted to rise, resulting in a decrease in resistance. This PEDOT: PSS based temperature sensor showed a 70% change in resistance for a temperature change of $\sim 60^\circ C$. Jacopo et al. [79] developed a dual-mode highly flexible hydrogel-based H_2O_2 sensor, which is based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene): polystyrene sulfonate (PEDOT: PSS) as the transducer, hydrophilic polyurethane (HPU) as the hydrogel matrix, and horseradish peroxidase (HRP) as the H_2O_2 specific redox enzyme. The solution containing PEDOT: PSS/HPU/HRP was applied onto the work electrode of a three-electrode system using a drop-casting method. The sensor operated in both amperometric and chemiresistive dual modes. The sensing mechanism can be explained as follows. In the amperometric mode, H_2O_2 undergoes electrochemical reduction in the presence of HRP to produce water and oxygen on the surface of the modified electrode [175]. The process entails the alteration of the oxidation state of the iron ion within the heme group present in HRP, resulting in the discharge of electrons that are subsequently transmitted to the electrode, thereby inducing a current peak [176,177]. Conductive PEDOT: PSS plays a key role in the direct electron transfer between the enzyme and the electrode [178]. In the chemiresistive mode, the sensing mechanism relies on the conformational change of PEDOT between two molecular structures, quinoid and benzoid, in response to H_2O_2 . The quinoid group, which has alternating double bonds and more charges, is more conductive form leading to an increase in PEDOT: PSS conductivity. The change to the fibrillary-like structure of quinoid increases the delocalization of charges and π -electrons in the PEDOT backbone, resulting in higher conductivity. The conformational change to the coil-like benzoid structure reduces elec-

tron mobility [126,179]. The HRP and H_2O_2 reaction initiates the PEDOT conformational change to the quinoid structure, resulting in higher conductivity [178]. The amperometric sensor showed a rapid response time of less than 6 seconds, selectivity towards common interferents, and a broad detection range spanning from 100 μM to 101.6 mM.

Polypyrrole (PPy): PPy can be traced back to the 1919 studies by Angeli and Pieroni, who described the synthesis of pyrrole blacks from pyrrole magnesium bromide [180]. PPy is unique among the electronically conductive polymers in that the pristine form is oxidized by molecular oxygen [181]. PPy exhibits impressive conductivity, outstanding redox properties, biocompatibility, tunability and processability, as well as environmental stability, and could be widely applied in the field of chemical sensing [182,183,184]. Conductive polymer aerogels are considered a promising option to create versatile electronics due to their mechanical deformability and their 3D porous structures [185]. Compared to conventional porous materials, conductive polymer aerogels possess advantages such as regulated conductivity, low density, large specific surface areas, and interconnected channels, making them suitable for gas sensing applications [83]. Shu et al. [83] developed a paper substrate-based flexible H_2S sensor by incorporating Cu_2O -polypyrrole conductive aerogel (Cu_2O -PPy) into the sensor design. The aerogel is prepared by in situ polymerization of pyrrole with a “big-macromolecular surfactant” of graphene oxide (GO). GO is composed of both aromatic regions consisting of benzene rings and aliphatic regions consisting of oxygen-containing groups, which give it amphiphilic properties [186]. The surface of graphene oxide was improved by the self-assembly of positively charged pyrrole monomers through π - π stacking and electrostatic interactions, resulting in a better pyrrole dispersion. Additionally, the 3D porous structure of the coated aerogel was maintained on the paper substrate, and due to the combined mechanical properties of the aerogel and paper, the resulting paper electrode was mechanically flexible and could be easily cut into desired shapes. The sensing mechanism of this chemiresistive gas sensor can be speculated as follows. First, when the sensor was exposed to H_2S , some of the absorbed gas molecules dissociated into H^+ and S_2^- (HS^-). Secondly, the S_2^- readily reacted with semiconducting Cu_2O , transforming it into metallic Cu_2S with good conductivity [187,188]. This process facilitated the continuous dissociation of H_2S molecules, generating more H^+ ions. Thirdly, the dissociated H^+ ions protonated PPy, serving as the host conducting pathway, and facilitated electron transfer through multidimensional paths, including 2D nanosheets and 3D cross-linking frameworks, ultimately improving conduction [189]. The Cu_2O promoted the protonation of PPy. Fourthly, the aerogel's inherently hierarchical and porous micro-nanostructures of Cu_2O -PPy@GO, with a large surface area and pore volume, provided abundant reaction sites (such as vacancies, defects, functional groups, and sp^2 -bonded carbon) for gas molecule adsorption [190]. Moreover, the loose and porous structure facilitated rapid gas diffusion and worked simultaneously on both the internal and external surfaces. Overall, the exceptional sensing performance was attributed to the synergistic function of the micro-nanostructures, the strong chemical interaction between Cu_2O and H_2S , and the effective proton acid doping with PPy.

3.3. Nanohybrid materials

Nanohybrid materials are distinct combinations of inorganic and organic materials [191]. Compared to single-component materials, hybrid materials possess a diverse range of functionalities as well as enhanced chemical and physical properties. Advanced nanostructures that are based on organic/inorganic composites play a significant role in driving innovations across various fields [192,193]. Hybrid materials exhibit enhanced properties such as higher conductivity, increased porosity, improved catalytic activity, and greater optical and electrical potential compared to their single-component counterparts [194,195]. When polymeric materials are combined with metal oxides or other inorganic materials, the resulting composite can exhibit enhanced selectivity and unique sensing properties. This is due to the synergistic and geometrical effects of the different components [196,197]. Polymer materials and 2D graphene-based materials have been shown to have a large surface area and good electrical conductivity, but the performance of these devices can be further improved by synthesizing nanohybrid materials.

BP-Ti₃C₂-MXene: Zhu Xiaoyu et al. [115] designed an ultra-trace analysis phytoregulator α -naphthalene acetic acid (NAA) sensor fabricated by two-dimensional phosphorene (BP) nanohybrid with graphene-like titanium carbide MXene (Ti₃C₂-MXene). MXene, 2D material, can be synthesized by etching “A” from MAX phase (“M” represents transition metals, “A” represents group IIIA/IVA elements and “X” represents C and/or N elements) on the flexible substrate surface of laser-induced porous graphene (LIPG). A BP-Ti₃C₂-MXene nanohybrid with excellent ambient stability is produced through liquid-phase exfoliation of black phospho-

rus with cuprous chloride and Ti₃C₂-MXene, which is obtained by etching Al layers of Ti₃AlC₂, using ultrasonic assistance in an organic solvent. MXene has a unique thin-layered nanostructure that provides ample space for supporting other functionalized nanomaterials. However, the performance of MXene is compromised when its nanosheets restack too severely, which can damage the effective area [198]. To address this issue, a noncovalent nanohybrid between BP and MXene is expected to resolve the aggregation of MXene or BP and combine the advantages of both materials [199]. The sensing mechanism of this electrochemical sensor is as follows. In the amperometric mode, the working electrode modified with Ti₃C₂-MXene/BP biomimetic enzymes exhibits oxidase-like characteristics (nanozyme) when the zymolyte NAA is electrocatalytically oxidized. Electron transfer reactions generate measurable changes in current. Since the size of the measured current is proportional to the number of NAA molecules in the solution, the relative concentration of the molecules can be monitored on a physiological timeline [200]. The LOD of the sensor is as low as 1.6 nM with a wide linear range of 0.02–40 μM .

4. Principle of flexible sensing

The sensing layer of a flexible sensor interacts with physical disturbances or analytes, causing changes in its own physical properties, which are then transduced into variations of electrical signals (e. g., current, voltage/ Nernst potential, capacitance, etc.) or others by the transducer. In this section, we will discuss the sensing principle of electrically-transduced analytical flexible sensors from the aspects of sensing and transduction mechanisms.

4.1. Sensing mechanism

A typical sensing device consists of two primary elements: sensing material and the transducer [201]. The sensing material is accountable for responding to physical perturbation (e. g., temperature, humidity, pressure, mechanical deformation, etc.) or chemical/biological analytes (e. g., gases, pesticides, foodborne pathogens, etc.). This interaction results in a modification of one or more properties of the sensing material, which is subsequently transformed into detectable signals by the transducer [202–204]. Sensors capable of detecting physical changes have been achieved through the collaborative advancements in material development, involving the synthesis of materials with novel electrical, optical, and mechanical properties and refinement in the methods of integrating materials into devices [205]. In contrast, to advance electrically-transduced chemical sensing, there is an added level of complexity posed by the chemical interfaces between the sensing material and the analyte [201]. The chemical interfaces between the material and the analyte are crucial in determining the sensitivity, selectivity, stability, and biocompatibility of chemical sensing devices [206–208]. The interaction between sensing materials and analytes is a prerequisite for the operation of sensors.

We can classify these interactions as:

1. Non-covalent interactions, including van der Waals forces, hydrogen bonds, coordination bonds, and π - π interactions.

This may result in reversible or partially reversible reactions. For example, the large, electron-rich π -surface of graphene can interact with target analytes through van der Waals forces, charge transfer, and π - π interactions.

2. Covalent bonding.

This leads to irreversible reactions but brings improvements in selectivity and sensitivity. For example, metal oxides contain chemically adsorbed oxygen molecules on their surface, which are responsible for the interaction with gaseous analytes through oxygen-involved chemical reactions [64].

4.2. Transduction mechanism

The sensing material serves a dual purpose in chemical sensing. Firstly, it should have the ability to covalently or noncovalently interact with the analyte on its surface. Secondly, it should react to this interaction by altering its electrically related physical properties. The transduction mechanism relies on conductivity, work function, or electrical permittivity, which can be transformed into a change in resistance, capacitance, or inductance [203]. These transduction events, which involve changes in resistance/impedance, capacitance, current, and voltage/electrical potential, can be detected and measured using various devices such as resistors, electrochemical sensors, capacitors, diodes, and field-effect transistors. The magnitude, frequency, and phase of the resulting signal can provide important information about the sensing event [64]. In flexible sensing for food monitoring, the main transducers are resistors and electrochemical sensors, while capacitors are uncommon. Diodes and field-effect transistors are rarely seen. The modulation of doping level, Schottky barrier, and the formation of dipole and interfacial layer are the basic mechanisms that typically lead to changes in conductivity, work function, and permittivity [64].

REFERENCES

- World Health Organization (2022). Food Safety. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Accessed April 20, 2023.
- Misra, N.N., Dixit, Y., Al-Mallahi, A., Bhullar, M.S., Upadhyay, R., Martynenko, A. (2020). IoT, big data, and artificial intelligence in agriculture and food industry. *IEEE Internet of Things Journal*, 9(9), 6305–6324. <https://doi.org/10.1109/JIOT.2020.2998584>
- Aung, M.M., Chang, Y.S. (2014). Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control*, 39, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.007>
- Wu, D., Sun, D.W. (2013). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review – Part I: Fundamentals. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.014>
- Saravanan, A., Kumar, P.S., Hemavathy, R.V., Jeevanantham, S., Kamalesh, R., Sneha S. et al. (2021). Methods of detection of food-borne pathogens: review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 189–207. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01072-z>
- Samsidar, A., Siddiquee, S., Shaarani, S. (2018). A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.011>
- Zhao, F., Wu, J., Ying, Y., She, Y., Wang, J., Ping, J. (2018). Carbon nanomaterial-enabled pesticide biosensors: Design strategy, biosensing mechanism, and practical application. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 106, 62–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.017>
- Mostafalou, S., Abdollahi, M. (2017). Pesticides: An update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549–599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Wang, X., Zhang, M., Zhang, L., Xu, J., Xiao, X., Zhang, X. (2022). Inkjet-printed flexible sensors: From function materials, manufacture process, and applications perspective. *Materials Today Communications*, 31(5), Article 103263. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103263>
- Senapati, M., Sahu, P.P. (2020). Meat quality assessment using Au patch electrode Ag-SnO₂/SiO₂/Si MIS capacitive gas sensor at room temperature. *Food Chemistry*, 324, Article 126893. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126893>
- Guo, X., Ding, Y., Liang, C., Du, B., Zhao, C., Tan, Y. et al. (2022). Humidity-activated H₂S sensor based on SnSe₂/WO₃ composite for evaluating the spoilage of eggs at room temperature. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 357, Article 131424. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131424>
- Chen, H., Zhang, M., Bhandari, B., Yang, C.-h. (2020). Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness. *Food Hydrocolloids*, 100, Article 105458. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105458>
- Liu, K., Zhang, C. (2021). Volatile organic compounds gas sensor based on quartz crystal microbalance for fruit freshness detection: A review. *Food Chemistry*, 334, Article 127615. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127615>
- Senapati, M., Sahu, P.P. (2020). Onsite fish quality monitoring using ultra-sensitive patch electrode capacitive sensor at room temperature. *Biosensors and Bioelectronics*, 168, Article 112570. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112570>
- Cavanna, D., Zanardi, S., Dall'Asta, C., Suman, M. (2019). Ion mobility spectrometry coupled to gas chromatography: A rapid tool to assess eggs freshness. *Food Chemistry*, 271, 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.204>
- Liang, Y., Huang, X., Chen, X., Zhang, W., Ping, G., Xiong, Y. (2018). Plasmonic ELISA for naked-eye detection of ochratoxin A based on the tyramine-H₂O₂ amplification system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 259, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.004>
- Wang, K., Sun, D.W., Pu, H., Wei, Q. (2019). Surface-enhanced Raman scattering of core-shell Au@ Ag nanoparticles aggregates for rapid detection of difenoconazole in grapes. *Talanta*, 191, 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.005>
- Yang, N., You, T.-T., Gao, Y.-K., Zhang, C.-M., Yin, P.-G. (2018). Fabrication of a flexible gold nanorod polymer metafilm via a phase transfer method as a SERS substrate for detecting food contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6889–6896. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01702>
- Nguyen, T.H., Nguyen, T.D., Ly, N.H., Kwak, C.H., Huh, Y.S., Joo, S.-W. (2018). On-site detection of sub-mg/kg melamine mixed in powdered infant formula and chocolate using sharp-edged gold nanostar substrates. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 35(6), 1017–1026. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1466399>
- Liu, S., Bai, J., Huo, Y., Ning, B., Peng, Y., Li, S. et al. (2020). A zirconium-porphyrin MOF-based ratiometric fluorescent biosensor for rapid and ultrasensitive detection of chloramphenicol. *Biosensors and Bioelectronics*, 149, Article 111801. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111801>
- Shi, Q., He, T., Lee, C. (2019). More than energy harvesting – Combining triboelectric nanogenerator and flexible electronics technology for enabling novel micro-/nano-systems. *Nano Energy*, 57, 851–871. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2019.01.002>
- Vicente, A.T., Araújo, A., Mendes, M.J., Nunes, D., Oliveira, M.J., Sanchez-Sobrado, O. et al. (2018). Multifunctional cellulose-paper for light harvesting and smart sensing applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 6(13), 3143–3181. <https://doi.org/10.1039/C7TC05271E>
- Guo, J., Yu, Y., Cai, L., Wang, Y., Shi, K., Wang, Y., Shi, K., Shanget, L. et al. (2021). Microfluidics for flexible electronics. *Materials Today*, 44, 105–135. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.08.017>
- Hu, L., Chee, P.L., Sugiarto, S., Yu, Y., Shi, C., Yanet, R. et al. (2022). Hydrogel-based flexible electronics. *Advanced Materials*, 35(14), Article 2205326. <https://doi.org/10.1002/adma.202205326>
- Crabb, R.L., Treble, F.C. (1967). Thin silicon solar cells for large flexible arrays. *Nature*, 213, 1223–1224. <https://doi.org/10.1038/2131223a0>
- Shirakawa, H., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Chiang, Ch. K., Heeger, A.J. (1977). Synthesis of electrically conducting organic polymers: Halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 16, 578–580. <https://doi.org/10.1039/C39770000578>
- Ling, Z., Ren, C.E., Zhao, M.Q., Yang, J., Giammarco, J.M., Qiu, J. et al. (2014). Flexible and conductive MXene films and nanocomposites with high capacitance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16676–16681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414215111>
- Vosgueritchian, M., Lipomi, D.J., Bao, Z. (2012). Highly conductive and transparent PEDOT: PSS films with a fluorosurfactant for stretchable and flexible transparent electrodes. *Advanced Functional Materials*, 22(2), 421–428. <https://doi.org/10.1002/adfm.201101775>
- Zhou, Y., Wan, C., Yang, Y., Yang, H., Wang, S., Dai, Z. et al. Highly stretchable, elastic, and ionic conductive hydrogel for artificial soft electronics. *Advanced Functional Materials*, 29(1), Article 1806220. <https://doi.org/10.1002/adfm.201806220>
- Li, D., Lai, W.Y., Zhang, Y.Z., Huang, W. (2018). Printable transparent conductive films for flexible electronics. *Advanced Materials*, 30(10), Article 1704738. <https://doi.org/10.1002/adma.201704738>
- Lipomi, D.J., Lee, J.A., Vosgueritchian, M., Tee, B.C.-K., Bolander, J.A., Bao Z. (2012). Electronic properties of transparent conductive films of PEDOT: PSS on stretchable substrates. *Chemistry of Materials*, 24(2), 373–382. <https://doi.org/10.1021/cm203216m>
- Chun, K.Y., Oh, Y., Rho, J., Ahn, J.-H., Kim, Y.-J., Choi, H.R. et al. (2010). Highly conductive, printable and stretchable composite films of carbon nanotubes and silver. *Nature Nanotechnology*, 5(12), 853–857. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.232>
- Kayser, L.V., Lipomi, D.J. (2019). Stretchable conductive polymers and composites based on PEDOT and PEDOT: PSS. *Advanced Materials*, 31(10), Article 1806133. <https://doi.org/10.1002/adma.201806133>
- Wang, Z., Cui, H., Li, S., Feng, X., Aghassi-Hagmann, J., Azizian, S. et al. (2021). Facile approach to conductive polymer microelectrodes for flexible electronics. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 13(18), 21661–21668. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c22519>
- Glarum, S.H. (1963). Electron mobilities in organic semiconductors. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 24(12), 1577–1583. [https://doi.org/10.1016/0022-3697\(63\)90100-8](https://doi.org/10.1016/0022-3697(63)90100-8)
- Kronick, P.L., Labes, M.M. (1961). Organic Semiconductors. V. Comparison of measurements on single-crystal and compressed microcrystalline molecular complexes. *The Journal of Chemical Physics*, 35(6), 2016–2019. <https://doi.org/10.1063/1.1732203>
- Chittick, R.C., Alexander, J.H., Sterling, H.F. (1969). The preparation and properties of amorphous silicon. *Journal of the Electrochemical Society*, 116(1), Article 77. <https://doi.org/10.1149/1.2411779>
- Nomura, K., Ohta, H., Takagi, A., Kamiya, T., Hirano, M., Hosono, H. (2004). Room-temperature fabrication of transparent flexible thin-film transistors using amorphous oxide semiconductors. *Nature*, 432(7016), 488–492. <https://doi.org/10.1038/nature03090>
- Sun, X., Qin, Z., Ye, L., Zhang, H., Yu, Q., Wu, X. et al. (2020). Carbon nanotubes reinforced hydrogel as flexible strain sensor with high stretchability and mechanically toughness. *Chemical Engineering Journal*, 382, Article 122832. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122832>
- Qin, Z., Sun, X., Yu, Q., Zhang, H., Wu, X., Yaoet, M. et al. (2020). Carbon nanotubes/hydrophobically associated hydrogels as ultrastretchable, highly sensitive, stable strain, and pressure sensors. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(4), 4944–4953. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b21659>
- Li, X., Zhang, R., Yu, W., Wang, K., Wei, J., Wu, D. et al. (2012). Stretchable and highly sensitive graphene-on-polymer strain sensors. *Scientific Reports*, 2(1), Article 870. <https://doi.org/10.1038/srep00870>
- Yan, C., Wang, J., Kang, W., Cui, M., Wang, X., Fooet, C.Y. et al. (2014). Highly stretchable piezoresistive graphene – nanocellulose nanopaper for strain sensors. *Advanced Materials*, 26(13), 2022–2027. <https://doi.org/10.1002/adma.201304742>
- Amjadi, M., Pichitpajongkit, A., Lee, S., Ryu, S., Park, I. (2014). Highly stretchable and sensitive strain sensor based on silver nanowire – elastomer nanocomposite. *ACS Nano*, 8(5), 5154–5163. <https://doi.org/10.1021/nn501204t>
- Xia, J., Wang, X., Zhang, J., Kong, C., Huang, W., Zhang, X. (2022). Flexible dual-mechanism pressure sensor based on Ag nanowire electrodes for nondestructive grading and quality monitoring of fruits. *ACS Applied Nano Materials*, 5(8), 10652–10662. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c01968>
- Park, B., Kim, J., Kang, D., Jeong, C., Kim, K.S., Kimet, J.U. et al. (2016). Dramatically enhanced mechanosensitivity and signal-to-noise ratio of nanoscale crack-based sensors: effect of crack depth. *Advanced Materials*, 28(37), 8130–8137. <https://doi.org/10.1002/adma.201602425>
- Park, J., Lee, Y., Hong, J., Lee, Y., Ha, M., Jung, Y. et al. (2014). Tactile-direction-sensitive and stretchable electronic skins based on human-skin-inspired interlocked microstructures. *ACS Nano*, 8(12), 12020–12029. <https://doi.org/10.1021/nn505953t>
- Bao, Z., Chen, X. (2016). Flexible and stretchable devices. *Advanced Materials*, 28(22), 4177–4179. <https://doi.org/10.1002/adma.201601422>
- Xu, J., Ma, R., Stankovski, S., Liu, X., Zhang, X. (2022). Intelligent dynamic quality prediction of chilled chicken with integrated IoT flexible sensing and knowledge rules extraction. *Foods*, 11(6), Article 836. <https://doi.org/10.3390/foods11060836>
- Huang, W., Wang, X., Xia, J., Li, Y., Zhang, L., Fenget, H. et al. (2023). Flexible sensing enabled agri-food cold chain quality control: A review of mechanism analysis, emerging applications, and system integration. *Trends in Food Science and Technology*, 133, 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.010>

50. Feng, H., Zhang, M., Gecevskas, V., Chen, B., Saeed, R., Zhang, X. (2022). Modeling and evaluation of quality monitoring based on wireless sensor and blockchain technology for live fish waterless transportation. *Computers and Electronics in Agriculture*, 193, Article 106642. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2021.106642>
51. Xiao, X., Mu, B., Cao, G. (2021). Light-energy-harvested flexible wireless temperature-sensing patch for food cold storage. *ACS Applied Electronic Materials*, 3(7), 3015–3022. <https://doi.org/10.1021/acsaem.1c00251>
52. Mu, B., Cao, G., Zhang, L., Zou, Y., Xiao, X. (2021). Flexible wireless pH sensor system for fish monitoring. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 34, Article 100465. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100465>
53. Xiao, X., Mu, B., Cao, G., Yang, Y., Wang, M. (2022). Flexible battery-free wireless electronic system for food monitoring. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 7(2), Article 100430. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2022.100430>
54. Xu, J., Yang, Z., Wang, Z., Li, J., Zhang, X. (2023). Flexible sensing enabled packaging performance optimization system (FS-PPOS) for lamb loss reduction control in E-commerce supply chain. *Food Control*, 145, Article 109394. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109394>
55. Wang, M., Luo, D., Liu, M., Zhang, R., Wu, Z., Xiao, X. (2023). Flexible wearable optical wireless sensing system for fruit monitoring. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 8(2), Article 100555. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2023.100555>
56. Boahen, E.K., Pan, B., Kweon, H., Kim, J.S., Choi, H., Konget, Z. et al. (2022). Ultrafast, autonomous self-healable iontronic skin exhibiting piezo-ionic dynamics. *Nature Communications*, 13(1), Article 7699. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35434-8>
57. Gao, W., Emaminejad, S., Nyein, H.Y.Y., Challa, S., Chen, K., Peckett, A. et al. (2016). Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis. *Nature*, 529(7587), 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature16521>
58. Escobedo, P., Bhattacharjee, M., Nikbakhtnasrabadi, F., Dahiya, R. (2021). Flexible strain and temperature sensing NFC tag for smart food packaging applications. *IEEE Sensors Journal*, 21(23), 26406–26414. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2021.3100876>
59. Molina-Lopez, F., Briand, D., de Rooij, N.F. (2012). All additive inkjet printed humidity sensors on plastic substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166–167, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.02.042>
60. Jović, M., Hidalgo-Acosta, J.C., Lesch, A., Bassetto, V.C., Smirnov, E., Cortés-Salazar, F. et al. (2018). Large-scale layer-by-layer inkjet printing of flexible iridium-oxide based pH sensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 819, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.11.032>
61. Mu, B., Dong, Y., Qian, J., Wang, M., Yang, Y., Nikitina, M.A. et al. (2022). Hydrogel coating flexible pH sensor system for fish spoilage monitoring. *Materials Today Chemistry*, 26, Article 101183. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101183>
62. Won, S., Won, K. (2021). Self-powered flexible oxygen sensors for intelligent food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 29, Article 100713. <https://doi.org/10.1016/j.foodpsl.2021.100713>
63. Giaretta, J.E., Duan, H., Farajikhah, S., Oveissi, F., Dehghani, F., Naficy, S. (2022). A highly flexible, physically stable, and selective hydrogel-based hydrogen peroxide sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 371, Article 132483. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132483>
64. Meng, Z., Stolz, R.M., Mendecki, L., Mirica, K.A. (2019). Electrically-transduced chemical sensors based on two-dimensional nanomaterials. *Chemical Reviews*, 119(1), 478–598. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00311>
65. Wang, X., Liu, Z., Zhang, T. (2017). Flexible sensing electronics for wearable/attachable health monitoring. *Small*, 13(25), Article 1602790. <https://doi.org/10.1002/smll.201602790>
66. Gao, Y., Yu, L., Yeo, J.C., Lim, C.T. (2020). Flexible hybrid sensors for health monitoring: materials and mechanisms to render wearability. *Advanced Materials*, 32(15), Article 1902133. <https://doi.org/10.1002/adma.201902133>
67. Bag, A., Lee, N.E. (2021). Recent advancements in development of wearable gas sensors. *Advanced Materials Technologies*, 6(3), Article 2000883. <https://doi.org/10.1002/admt.202000883>
68. Liang, J., Li, L., Niu, X., Pei, Q. (2013). Elastomeric polymer light-emitting devices and displays. *Nature Photonics*, 7(10), 817–824. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2013.242>
69. Yu, Z., Niu, X., Liu, Z., Pei, Q. (2011). Intrinsically stretchable polymer light-emitting devices using carbon nanotube-polymer composite electrodes. *Advanced Materials*, 23(34), 3989–3994. <https://doi.org/10.1002/adma.201101986>
70. Yan, C., Wang, J., Wang, X., Kang, W., Cui, M., Foo, C.Y. et al. (2014). An intrinsically stretchable nanowire photodetector with a fully embedded structure. *Advanced Materials*, 26(6), 943–950. <https://doi.org/10.1002/adma.201304226>
71. Ho, D.H., Sun, Q., Kim, S.Y., Han, J.T., Kim, D.H., Cho, J.H. (2016). Stretchable and multimodal all graphene electronic skin. *Advanced Materials*, 28(13), 2601–2608. <https://doi.org/10.1002/adma.201505739>
72. Li, W., Chen, R., Qi, W., Cai, L., Sun, Y., Sun, M. et al. (2019). Reduced graphene oxide/mesoporous ZnO NSs hybrid fibers for flexible, stretchable, twisted, and wearable NO₂ E-textile gas sensor. *ACS Sensors*, 4(10), 2809–2818. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01509>
73. Dai, X., Huang, L.B., Du, Y., Han, J., Kong, J. (2021). Self-healing flexible strain sensors based on dynamically cross-linked conductive nanocomposites. *Composites Communications*, 24, Article 100654. <https://doi.org/10.1016/j.coco.2021.100654>
74. Gupta, A.K., Mishra, P., Senapati, M., Sahu, P.P. (2021). A novel electrochemical device for naringin quantification and removal from bitter variety of citrus fruits. *Journal of Food Engineering*, 306, Article 110637. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110637>
75. Lan, K., Wang, Z., Yang, X., Wei, J., Qin, Y., Qin, G. (2022). Flexible silicon nanowires sensor for acetone detection on plastic substrates. *Nanotechnology*, 33(15), Article 155502. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ac46b3>
76. Lonsdale, W., Wajrak, M., Alameh, K. (2018). Manufacture and application of RuO₂ solid-state metal-oxide pH sensor to common beverages. *Talanta*, 180, 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.070>
77. Han, S.T., Peng, H., Sun, Q., Venkatesh, S., Chung, K.-S., Lau, S.C. et al. (2017). An overview of the development of flexible sensors. *Advanced Materials*, 29(33), Article 1700375. <https://doi.org/10.1002/adma.201700375>
78. Zhang, J., Wang, X., Xia, J., Xing, S., Zhang, X. (2022). Flexible sensing enabled intelligent manipulator system (FSIMS) for avocados (Persea Americana Mill) ripeness grading. *Journal of Cleaner Production*, 363, Article 132599. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132599>
79. Root, S.E., Savagatrup, S., Printz, A.D., Rodriguez, D., Lipomi, D.J. (2017). Mechanical properties of organic semiconductors for stretchable, highly flexible, and mechanically robust electronics. *Chemical Reviews*, 117(9), 6467–6499. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00003>
80. Onorato, J., Pakhnyuk, V., Luscombe, C.K. (2017). Structure and design of polymers for durable, stretchable organic electronics. *Polymer Journal*, 49(1), 41–60. <https://doi.org/10.1038/pj.2016.76>
81. Huang, W.D., Deb, S., Seo, Y.S., Rao, S., Chiao, M., J.C. (2011). A passive radio-frequency pH-sensing tag for wireless food-quality monitoring. *IEEE Sensors Journal*, 12(3), 487–495. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2011.2107738>
82. Yousefi, H., Ali, M.M., Su, H.M., Filipe, C.D.M., Didar, T.F. (2018). Sentinel wraps: real-time monitoring of food contamination by printing DNzyme probes on food packaging. *ACS Nano*, 12(4), 3287–3294. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08010>
83. Shu, J., Qiu, Z., Tang, D. (2018). Self-referenced smartphone imaging for visual screening of H₂S using Cu x O-polypyrrole conductive aerogel doped with graphene oxide framework. *Analytical Chemistry*, 90(16), 9691–9694. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05011>
84. Fallatah, A., Kuperus, N., Almomtan, M., Padalkar, S. (2022). Sensitive biosensor based on shape-controlled ZnO Nanostructures grown on flexible porous substrate for pesticide detection. *Sensors*, 22(9), Article 3522. <https://doi.org/10.3390/s22093522>
85. Zhang, S., Hubis, E., Tomasello, G., Soliveri, G., Kumar, P., Cicoira, F. (2017). Patterned of stretchable organic electrochemical transistors. *Chemistry of Materials*, 29(7), 3126–3132. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b00181>
86. Wang, L., Yue, X., Sun, Q., Zhang, L., Ren, G., Lu, G. et al. (2021). Flexible organic electrochemical transistors for chemical and biological sensing. *Nano Research*, 15, 2433–2464. <https://doi.org/10.1007/s12274-021-3856-3>
87. Paschoalin, R.T., Gomes, N.O., Almeida, G.F., Bilatto, S., Farinas, C.S., Machado, S.A.S. et al. (2022). Wearable sensors made with solution-blow spinning poly (lactic acid) for non-enzymatic pesticide detection in agriculture and food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 199, Article 115875. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.115875>
88. Raymundo-Pereira, P.A., Gomes, N.O., Shimizu, F.M., Machado, S.A.S., Oliveira Jr., O.N. (2021). Selective and sensitive multiplexed detection of pesticides in food samples using wearable, flexible glove-embedded non-enzymatic sensors. *Chemical Engineering Journal*, 408, Article 127279. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127279>
89. Xu, X.Y., Yan, B., Lian, X. (2018). Wearable glove sensor for non-invasive organophosphorus pesticide detection based on a double-signal fluorescence strategy. *Nanoscale*, 10(28), 13722–13729. <https://doi.org/10.1039/c8nr03352h>
90. Mishra, R.K., Hubble, L.J., Martin, A., Kumar, R., Barfidokht, A., Kim, J. et al. (2017). Wearable flexible and stretchable glove biosensor for on-site detection of organophosphorus chemical threats. *ACS Sensors*, 2(4), 553–561. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00051>
91. Vanegas, D.C., Patiño, L., Mendez, C., de Oliveira, D.A., Torres, A.M., Gomes, C.L. et al. (2018). Laser scribed graphene biosensor for detection of biogenic amines in food samples using locally sourced materials. *Biosensors*, 8(2), Article 42. <https://doi.org/10.3390/bios8020042>
92. Aparicio-Martínez, E., Ibarra, A., Estrada-Moreno, I.A., Osuna, V., Domínguez, R.B. (2019). Flexible electrochemical sensor based on laser scribed Graphene/Ag nanoparticles for non-enzymatic hydrogen peroxide detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 301, Article 127101. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127101>
93. Escobedo, P., Erenas, M.M., Lopez-Ruiz, N., Carvajal, M.A., Gonzalez-Chocano, S., de Orbe-Payá, I. et al. (2017). Flexible passive near field communication tag for multigas sensing. *Analytical Chemistry*, 89(3), 1697–1703. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03901>
94. Vahidpour, F., Oberländer, J., Schöning, M.J. (2018). Flexible calorimetric gas sensors for detection of a broad concentration range of gaseous hydrogen peroxide: A step forward to online monitoring of food-package sterilization processes. *Physica Status Solidi*, 215(15), Article 1800044. <https://doi.org/10.1002/pssa.201800044>
95. Lahcen, A.A., Rauf, S., Beduk, T., Durmus, C., Aljedaibi, A., Timur, S. et al. (2020). Electrochemical sensors and biosensors using laser-derived graphene: A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, 168, Article 112565. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112565>
96. Geim, A.K. (2011). Random walk to graphene (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 50(31), 6966–6985. <https://doi.org/10.1002/anie.201101174>
97. Morales-Narváez, E., Baptista-Pires, L., Zamora-Gálvez, A., Merkoçi, A. (2017). Graphene-based biosensors: Going simple. *Advanced Materials*, 29(7), Article 1604905. <https://doi.org/10.1002/adma.201604905>
98. Huang, J.Y., Ding, F., Yakobson, B.I., Li, J. (2009). In situ observation of graphene sublimation and multi-layer edge reconstructions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10103–10108. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905193106>
99. Soares, R.R.A., Hjort, R.G., Pola, C.C., Parate, K., Reis, E.L., Soares, N.F.F. et al. (2020). Laser-induced graphene electrochemical immunosensors for rapid and label-free monitoring of Salmonella enterica in chicken broth. *ACS Sensors*, 5(7), 1900–1911. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02345>

100. Tang, N., Zhou, C., Xu, L., Jiang, Y., Qu, H., Duan, X. (2019). A fully integrated wireless flexible ammonia sensor fabricated by soft nano-lithography. *ACS Sensors*, 4(3), 726–732. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01690>
101. Alrammouz, R., Podlecki, J., Abboud, P., Sorli, B., Habchi, R. (2018). A review on flexible gas sensors: From materials to devices. *Sensors and Actuators A: Physical*, 284, 209–231. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2018.10.036>
102. Lin, L., Hu, Y., Xu, C., Zhang, Y., Zhang, R., Wen, X. et al. (2013). Transparent flexible nanogenerator as self-powered sensor for transportation monitoring. *Nano Energy*, 2(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2012.07.019>
103. Liaw, D.J., Hsu, P.N., Chen, W.H., Lin, S.-L. (2002). High glass transitions of new polyamides, polyimides, and poly (amide-imide) s containing a triphenylamine group: Synthesis and characterization. *Macromolecules*, 35(12), 4669–4676. <https://doi.org/10.1021/ma001523u>
104. Polyethylene terephthalate (Polyester, PET, PETP) — Film- Material information. Retrieved from <http://www.goodfellow.com>. Accessed April 20, 2023
105. Polyesters (Thermoplastic) PETP, PBT, PET. Retrieved from <http://www.bpf.co.uk/plastipedia/polymers/Polyesters.aspx>. Accessed April 20, 2023
106. Schneider, F., Fellner, T., Wilde, J., Wallrabe, U. (2008). Mechanical properties of silicones for MEMS. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18(6), Article 065008. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/18/6/065008>
107. Hu, S., Ren, X., Bachman, M., Sims, C.E., Li, G.P., Allbritton, N. (2002). Surface modification of poly (dimethylsiloxane) microfluidic devices by ultraviolet polymer grafting. *Analytical Chemistry*, 74(16), 4117–4123. <https://doi.org/10.1021/ac025700w>
108. Oishi, Y., Nakaya, M., Matsui, E., Hotta, A. (2015). Structural and mechanical properties of cellulose composites made of isolated cellulose nanofibers and poly (vinyl alcohol). *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 73, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.02.026>
109. Tai, H., Duan, Z., Wang, Y., Wang, S., Jiang, Y. (2020). Paper-based sensors for gas, humidity, and strain detections: A review. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(28), 31037–31053. <https://doi.org/10.1021/acami.0c06435>
110. Güder, F., Ainla, A., Redston, J., Mosadegh, B., Glavan, A., Martin, T.J. et al. (2019). Paper-based electrical respiration sensor. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(19), 5727–5732. <https://doi.org/10.1002/anie.201511805>
111. Jiang, Y., Zhu, N. (2020). Flexible and printed electronics for smart clothes. Chapter in a book: *Flexible and Wearable Electronics for Smart Clothing*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2020. <https://doi.org/10.1002/9783527818556.ch11>
112. Zeng, Y., Li, Q., Wang, W., Wen, Y., Ji, K., Liu, X. et al. (2022). The fabrication of a flexible and portable sensor based on home-made laser-induced porous graphene electrode for the rapid detection of sulfonamides. *Microchemical Journal*, 182, Article 107898. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107898>
113. Chen, Q., Liu, D., Lin, L., Wu, J. (2019). Bridging interdigitated electrodes by electrochemical-assisted deposition of graphene oxide for constructing flexible gas sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 286, 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.024>
114. Xu, G., Li, X., Cheng, C., Yang, J., Liu, Z., Shi, Z. et al. (2020). Fully integrated battery-free and flexible electrochemical tag for on-demand wireless in situ monitoring of heavy metals. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 310, Article 127809. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127809>
115. Zhu, X., Lin, L., Wu, R., Zhu, Y., Sheng, Y., Nie, P. et al. (2021). Portable wireless intelligent sensing of ultra-trace phytoestrogen α -naphthalene acetic acid using self-assembled phosphorene/Ti₃C₂ MXene nanohybrid with high ambient stability on laser induced porous graphene as nanozyme flexible electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 179, Article 113062. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113062>
116. Shahrababaki, Z., Farajikhah, S., Ghasemian, M.B., Oveissi, F., Rath, R.J., Yun, J. et al. (2023). A flexible and polymer-based chemiresistive CO₂ gas sensor at room temperature. *Advanced Materials Technologies*, 8(10), Article 2201510. <https://doi.org/10.1002/admt.202201510>
117. Yan, H., Zhao, G., Lu, W., Hu, C., Wang, X., Liu, G. et al. (2023). A flexible and wearable paper-based chemiresistive sensor modified with SWCNTs-PdNPs-polystyrene microspheres composite for the sensitive detection of ethylene gas: A new method for the determination of fruit ripeness and corruption. *Analytica Chimica Acta*, 1239, Article 340724. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340724>
118. Rim, Y.S., Bae, S.H., Chen, H., De Marco, N., Yang, Y. (2016). Recent progress in materials and devices toward printable and flexible sensors. *Advanced Materials*, 28(22), 4415–4440. <https://doi.org/10.1002/adma.201505118>
119. Sinar, D., Knopf, G.K. (2014, 18–21 August). *Printed graphene interdigitated capacitive sensors on flexible polyimide substrates*. Proceedings of the 14th IEEE International Conference on Nanotechnology, Toronto, ON, Canada. IEEE, 538–542. <https://doi.org/10.1109/NANO.2014.6968041>
120. Zhang, Y., Xiao, J., Sun, Y., Wang, L., Dong, X., Ren, J. et al. (2018). Flexible nanohybrid microelectrode based on carbon fiber wrapped by gold nanoparticles decorated nitrogen doped carbon nanotube arrays: In situ electrochemical detection in live cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.038>
121. Llobet, E. (2013). Gas sensors using carbon nanomaterials: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.014>
122. Cosnier, S., Karyakin, A. (2011). *Electropolymerization: Concepts, materials and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.
123. Kurra, N., Jiang, Q., Nayak, P., Alshareef, H.N. (2019). Laser-derived graphene: A three-dimensional printed graphene electrode and its emerging applications. *Nano Today*, 24, 81–102. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.12.003>
124. Strong, V., Dubin, S., El-Kady, M.F., Lech, A., Wang, Y., Weiller, B.H. et al. (2012). Patterning and electronic tuning of laser scribed graphene for flexible all-carbon devices. *ACS Nano*, 6(2), 1395–1403. <https://doi.org/10.1021/nn204200w>
125. Griffiths, K., Dale, C., Hedley, J., Kowal, M.D., Kaner, R.B., Keegan, N. (2014). Laser-scribed graphene presents an opportunity to print a new generation of disposable electrochemical sensors. *Nanoscale*, 6(22), 13613–13622. <https://doi.org/10.1039/c4nr04221b>
126. Shi, H., Liu, C., Jiang, Q., Xu, J. (2015). Effective approaches to improve the electrical conductivity of PEDOT: PSS: A review. *Advanced Electronic Materials*, 1(4), Article 1500017. <https://doi.org/10.1002/aeml.201500017>
127. Lang, U., Müller, E., Naujoks, N., Dual, J. (2009). Microscopical investigations of PEDOT: PSS thin films. *Advanced Functional Materials*, 19(8), 1215–1220. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801258>
128. Fan, Z., Ouyang, J. (2019). Thermoelectric properties of PEDOT: PSS. *Advanced Electronic Materials*, 5(11), Article 1800769. <https://doi.org/10.1002/aeml.201800769>
129. Jariwala, D., Sangwan, V.K., Lauhon, L.J., Marksab, T.J., Hersam, M.C. (2015). Carbon nanomaterials for electronics, optoelectronics, photovoltaics, and sensing. *Chemical Society Reviews*, 42(7), 2824–2860. <https://doi.org/10.1039/c2cs35353k>
130. Wang, F., Liu, S., Shu, L., Tao, X.-M. (2017). Low-dimensional carbon based sensors and sensing network for wearable health and environmental monitoring. *Carbon*, 121, 353–367. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.06.006>
131. Iijima, S., Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363(6430), 603–605. <https://doi.org/10.1038/363603a0>
132. Kong, J., Franklin, N.R., Zhou, C., Chapline, M.G., Peng, S., Cho, K. et al. (2000). Nanotube molecular wires as chemical sensors. *Science*, 287(5453), 622–625. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.622>
133. Nguyen, H.Q., Huh, J.S. (2006). Behavior of single-walled carbon nanotube-based gas sensors at various temperatures of treatment and operation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 117(2), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.11.056>
134. Peng, S., Cho, K., Qi, P., Dai, H. (2004). Ab initio study of CNT NO₂ gas sensor. *Chemical Physics Letters*, 387(4–6), 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.02.026>
135. Zhao, J., Buldum, A., Han, J., Lu, J.P. (2002). Gas molecule adsorption in carbon nanotubes and nanotube bundles. *Nanotechnology*, 13(2), Article 195. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/13/2/312>
136. Samarasekara, P. (2009). Hydrogen and methane gas sensors synthesis of multi-walled carbon nanotubes. *Chinese Journal of Physics*, 47(3), 361–369.
137. Geim, A.K., Novoselov, K.S. (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*, 6(3), 183–191. <https://doi.org/10.1038/nmat1849>
138. Huo, P., Zhao, P., Wang, Y., Yin, G., Dong, M. A. (2018). A roadmap for achieving sustainable energy conversion and storage: Graphene-based composites used both as an electrocatalyst for oxygen reduction reactions and an electrode material for a supercapacitor. *Energies*, 11(1), Article 167. <https://doi.org/10.3390/en11010167>
139. Novoselov, K.S., Fal'ko, V.I., Colombo, L., Gellert, P.R., Schwab, M.G., Kim, K. (2012). A roadmap for graphene. *Nature*, 490(7419), 192–200. <https://doi.org/10.1038/nature11458>
140. Neto, A.H.C., Guinea, F., Peres, N.M.R., Novoselov, K.S., Geim, A.K. (2009). The electronic properties of graphene. *Reviews of Modern Physics*, 81(1), Article 109. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.81.109>
141. He, Q., Wu, S., Yin, Z., Zhang, H. (2012). Graphene-based electronic sensors. *Chemical Science*, 3(6), 1764–1772. <https://doi.org/10.1039/C2SC20205K>
142. Yuan, W., Shi, G. (2013). Graphene-based gas sensors. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(35), 10078–10091. <https://doi.org/10.1039/c3ta11774j>
143. Yavari, F., Koratkar, N. (2012). Graphene-based chemical sensors. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(15), 1746–1753. <https://doi.org/10.1021/jz300358t>
144. Stine, R., Mulvaney, S.P., Robinson, J.T., Tamanaha, C.R., Sheehan, P.E. (2013). Fabrication, optimization, and use of graphene field effect sensors. *Analytical Chemistry*, 85(2), 509–521. <https://doi.org/10.1021/ac303190w>
145. Fang, Y., Wang, E. (2013). Electrochemical biosensors on platforms of graphene. *Chemical Communications*, 49(83), 9526–9539. <https://doi.org/10.1039/c3cc44735a>
146. Yu, X., Cheng, H., Zhang, M., Zhao, Y., Qu, L., Shi, G. (2017). Graphene-based smart materials. *Nature Reviews Materials*, 2(9), Article 17046. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.46>
147. Guo, Sh., Dong, Sh. (2011). Graphene and its derivative-based sensing materials for analytical devices. *Journal of Materials Chemistry*, 21(46), 18503–18516. <https://doi.org/10.1039/C1JM13228H>
148. Wu, J., Pisula, W., Müllen, K. (2007). Graphenes as potential material for electronics. *Chemical Reviews*, 107(3), 718–747. <https://doi.org/10.1021/cr068010r>
149. Choi, W., Lahiri, I., Seelaboyina, R., Kang, Y.S. (2010). Synthesis of graphene and its applications: A review. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 35(1), 52–71. <https://doi.org/10.1080/10408430903505036>
150. Puma, M., Ambrosi, A., Bonanni, A., Chng, E.L.K., Poh, H.L. (2010). Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 954–965. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.011>
151. Jang, H., Park, Y.J., Chen, X., Das, T., Kim, M.-S., Ahn, J.-H. (2016). Graphene-based flexible and stretchable electronics. *Advanced Materials*, 28(22), 4184–4202. <https://doi.org/10.1002/adma.201504245>
152. Berger, C., Song, Z., Li, X., Wu, X., Brown, N., Naud, C. et al. (2006). Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene. *Science*, 312(5777), 1191–1196. <https://doi.org/10.1126/science.1125925>
153. Emtsev, K.V., Bostwick, A., Horn, K., Jobst, J., Kellogg, G.L., Ley, L. et al. (2009). Towards wafer-size graphene layers by atmospheric pressure graphitization of silicon carbide. *Nature Materials*, 8(3), 203–207. <https://doi.org/10.1038/nmat2382>
154. Geim, A.K. (2009). Graphene: status and prospects. *Science*, 324(5934), 1530–1534. <https://doi.org/10.1126/science.1158877>
155. Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S.V. et al. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696), 666–669. <https://doi.org/10.1126/science.1102896>
156. Li, X., Cai, W., An, J., Kim, S., Nah, J., Yang, D. et al. (2009). Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. *Science*, 324(5932), 1312–1314. <https://doi.org/10.1126/science.1171245>
157. Reina, A., Jia, X., Ho, J., Nezich, D., Son, H., Bulovic, V. et al. (2009). Layer area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. *Nano Letters*, 9(8), 3087–3087. <https://doi.org/10.1021/nl901829a>
158. Puma, M. (2013). Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids: Review. *Electrochemistry Communications*, 36, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.08.028>

159. Yuan, W., Zhou, Y., Li, Y., Li, C., Peng, H., Zhang, J. et al. (2013). The edge-and basal-plane-specific electrochemistry of a single-layer graphene sheet. *Scientific Reports*, 3(1), Article 2248. <https://doi.org/10.1038/srep02248>
160. Nezakati, T., Seifalian, A., Tan, A., Seifalian, A.M. (2018). Conductive polymers: Opportunities and challenges in biomedical applications. *Chemical Reviews*, 118(14), 6766–6843. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00275>
161. Hodgson, A.J., Gilmore, K., Small, C., Wallace, G.G., Mackenzie, I.L., Aoki, T. et al. (1994). Reactive supramolecular assemblies of mucopolysaccharide, polypyrrole and protein as controllable biocomposites for a new generation of 'intelligent biomaterials'. *Supramolecular Science*, 1(2), 77–83. [https://doi.org/10.1016/0968-5677\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0968-5677(94)90013-2)
162. Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(5), 345–359. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00312-8)
163. Park, A.R., Kim, J.S., Kim, K.S., Zhang, K., Park, J., Park, J.H. et al. (2014). Si-Mn/Reduced graphene oxide nanocomposite anodes with enhanced capacity and stability for lithium-ion batteries. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(3), 1702–1708. <https://doi.org/10.1021/am404608d>
164. Green, R.A., Baek, S., Poole-Warren, L.A., Martens, P.J. (2010). Conducting polymer-hydrogels for medical electrode applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1), Article 014107. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014107>
165. Schopf, G., Kossmehl, G. (1997). Polythiophenes-electrically conductive polymers. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1997.
166. Leclerc, M., Faid, K. (1997). Electrical and optical properties of processable polythiophene derivatives: Structure-property relationships. *Advanced Materials*, 9(14), 1087–1094. <https://doi.org/10.1002/adma.19970091404>
167. Yamamoto, T., Sanechika, K., Yamamoto, A. (1980). Preparation of thermally stable and electric-conducting poly (2, 5-thienylene). *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, 18(1), 9–12. <https://doi.org/10.1002/pol.1980.130180103>
168. Groenendaal, L., Jonas, F., Freitag, D., Pielartzik, H., Reynolds, J.R. (2000). Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: Past, present, and future. *Advanced Materials*, 12(7), 481–494. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(200004\)12:7<481::AID-ADMA481>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(200004)12:7<481::AID-ADMA481>3.0.CO;2-C)
169. Dietrich, M., Heinze, J., Heywang, G., Jonas, F. (1994). Electrochemical and spectroscopic characterization of polyalkylenedioxythiophenes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 369(1–2), 87–92. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(94\)87085-3](https://doi.org/10.1016/0022-0728(94)87085-3)
170. Pei, Q., Zuccarello, G., Ahlsgo, M., Inganäs, O. (1994). Electrochromic and highly stable poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) switches between opaque blue-black and transparent sky blue. *Polymer*, 35(7), 1347–1351. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(94\)90352-8](https://doi.org/10.1016/0032-3861(94)90352-8)
171. Karagkiozaki, V., Karagiannidis, P.G., Gioti, M., Kavatzikidou, P., Georgiou, D., Georgarakis, E. et al. (2013). Bioelectronics meets nanomedicine for cardiovascular implants: PEDOT-based nanocoatings for tissue regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(9), 4294–4304. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.019>
172. Lu, Y., Biswas, M.C., Guo, Z., Jeon, J.-W., Wujcik, E.K. (2019). Recent developments in bio-monitoring via advanced polymer nanocomposite-based wearable strain sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 123, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.037>
173. Vuorinen, T., Niittynen, J., Kankkunen, T., Kraft, T.M., Mäntysalo, M. (2016). Inkjet-printed graphene/PEDOT: PSS temperature sensors on a skin-conformable polyurethane substrate. *Scientific Reports*, 6(1), Article 35289. <https://doi.org/10.1038/srep35289>
174. Zhang, Y., Cui, Y. (2019). Development of flexible and wearable temperature sensors based on PEDOT: PSS. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 66(7), 3129–3133. <https://doi.org/10.1109/TED.2019.2914301>
175. Zhang, R., Xu, X., Fan, X., Yang, R., Wu, T., Zhang, C. (2018). Application of conducting micelles self-assembled from commercial poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Poly (styrene sulfonate) and chitosan for electrochemical biosensors. *Colloid and Polymer Science*, 296, 495–502. <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4270-6>
176. Mercante, L.A., Facure, M.H.M., Sanfelice, R.C., Migliorini, F.L., Mattoso, L.H.C., Correa, D.S. (2017). One-pot preparation of PEDOT: PSS-reduced graphene decorated with Au nanoparticles for enzymatic electrochemical sensing of H₂O₂. *Applied Surface Science*, 407, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.02.156>
177. Lopes, G.R., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S. (2014). Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. *RSC Advances*, 4(70), 37244–37265. <https://doi.org/10.1039/C4RA06094F>
178. Słoniewska, A., Kasztelan, M., Berbec, S., Palys, B. (2020). Influence of buffer solution on structure and electrochemical properties of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)/poly (styrenesulfonate) hydrogels. *Synthetic Metals*, 263, Article 116363. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2020.116363>
179. Mochizuki, Y., Horii, T., Okuzaki, H. (2012). Effect of pH on structure and conductivity of PEDOT/PSS. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 37(2), 307–310. <https://doi.org/10.14723/tmrj.37.307>
180. Borges, M. H. R., Nagay, B. E., Costa, R. C., Souza, J.G.S., Mathew, M.T., Barão, V.A.R. (2023). Recent advances of polypyrrole conducting polymer film for biomedical application: Toward a viable platform for cell-microbial interactions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 134, Article 102860. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102860>
181. Lei, J., Martin, Ch. R. (1995). Investigations of the chemical interactions between molecular oxygen and pristine (undoped) polypyrrole. *Chemistry of Materials*, 7(3), 578–584. <https://doi.org/10.1021/cm00051a020>
182. Li, X.-G., Huang, M.-R., Duan, W., Yang, Y.-L. (2002). Novel multifunctional polymers from aromatic diamines by oxidative polymerizations. *Chemical Reviews*, 102(9), 2925–3030. <https://doi.org/10.1021/cr010423z>
183. Wang, L.-X., Li, X.-G., Yang, Y.-L. (2001). Preparation, properties and applications of polypyrroles. *Reactive and Functional Polymers*, 47(2), 125–139. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00079-1](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00079-1)
184. Guimard, N.K., Gomez, N., Schmidt, Ch.E. (2007). Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*, 32(8–9), 876–921. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012>
185. Garlof, S., Mecklenburg, M., Smazna, D., Mishra, Y.K., Adelung, R., Schulte, K. et al. (2017). 3D carbon networks and their polymer composites: Fabrication and electromechanical investigations of neat Aerographite and Aerographite-based PNCs under compressive load. *Carbon*, 111, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.09.046>
186. Dreyer, D.R., Park, S., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S. (2010). The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 228–240. <https://doi.org/10.1039/b917103g>
187. Bajaj, B., Joh, H.I., Jo, S.M., Park, J.H., Yi, K.B., Lee, S. (2018). Enhanced reactive H₂S adsorption using carbon nanofibers supported with Cu/Cu₂O nanoparticles. *Applied Surface Science*, 429, 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.06.280>
188. Liang, X., Kim, T.H., Yoon, J.W., Kwak, C.-H., Lee, J.-H. (2015). Ultrasensitive and ultrasensitive detection of H₂S using electrospun CuO-loaded In₂O₃ nanofiber sensors assisted by pulse heating. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.130>
189. Lakard, B., Carquigny, S., Segut, O., Patois, T., Lakard, S. (2015). Gas sensors based on electrodeposited polymers. *Metals*, 5(3), 1371–1386. <https://doi.org/10.3390/met5031371>
190. Chu, J., Wang, X., Wang, D., Yang, A., Lva, P., Wu, Y. et al. (2018). Highly selective detection of sulfur hexafluoride decomposition components H₂S and SOF₂ employing sensors based on tin oxide modified reduced graphene oxide. *Carbon*, 135, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.04.037>
191. Tabish, M., Malik, M.U., Khan, M.A., Yasin, G., Asif, H.M., Anjumet, M.J. et al. (2021). Construction of NiCo/graphene nanocomposite coating with bulge-like morphology for enhanced mechanical properties and corrosion resistance performance. *Journal of Alloys and Compounds*, 867, Article 159138. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.159138>
192. Nadeem, M., Yasin, G., Arif, M., Tabassum, H., Bhatti, M.H., Mehmood, M. et al. (2021). Highly active sites of Pt/Er dispersed N-doped hierarchical porous carbon for trifunctional electrocatalyst. *Chemical Engineering Journal*, 409, Article 128205. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128205>
193. Yasin, G., Arif, M., Mehtab, T., Shakeel, M., Mushtaq, M.A., Kuma, A. et al. (2020). A novel strategy for the synthesis of hard carbon spheres encapsulated with graphene networks as a low-cost and large-scalable anode material for fast sodium storage with an ultralong cycle life. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 7(2), 402–410. <https://doi.org/10.1039/C9QI01105F>
194. Ibraheem, S., Chen, S., Peng, L., Li, J., Li, L., Liao, Q. et al. (2020). Strongly coupled iron selenides-nitrogen-bond as an electronic transport bridge for enhanced synergistic oxygen electrocatalysis in rechargeable zinc-O₂ batteries. *Applied Catalysis B: Environmental*, 265, Article 118569. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.118569>
195. Nadeem, M., Yasin, G., Arif, M., Bhatti, M.H., Sayin, K., Mehmood, M. et al. (2020). Pt-Ni@ PC900 hybrid derived from layered-structure Cd-MOF for fuel cell ORR activity. *ACS Omega*, 5(5), 2123–2132. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02741>
196. Hangarter, C.M., Chartuprayoon, N., Hernández, S.C., Choa, Y., Myung, N.V. (2013). Hybridized conducting polymer chemiresistive nano-sensors. *Nano Today*, 8(1), 39–55. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.12.005>
197. Miller, D.R., Akbar, S.A., Morris, P.A. (2014). Nanoscale metal oxide-based heterojunctions for gas sensing: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, 250–272. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.07.074>
198. Zheng, W., Zhang, P., Chen, J., Tian, W.B., Zhang, Y.M., Sun, Z.M. (2018). In situ synthesis of CNTs@ TiC_x hybrid structures by microwave irradiation for high-performance anodes in lithium ion batteries. *Journal of Materials Chemistry A*, 6(8), 3543–3551. <https://doi.org/10.1039/C7TA10394H>
199. Guo, X., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, D., Tang, X., Xu, X. et al. (2020). Boosting sodium storage in two-dimensional phosphorene/Ti₃C₂T_x MXene nanoarchitectures with stable fluorinated interphase. *ACS Nano*, 14(3), 3651–3659. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00177>
200. Bard, A.J., Faulkner, L.R., White, H.S. (2022). *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, 2022.
201. Banica, F.-G. (2012). *Chemical sensors and biosensors: Fundamentals and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012.
202. McEvoy, M.A., Correll, N. (2015). Materials that couple sensing, actuation, computation, and communication. *Science*, 347(6228), Article 1261689. <https://doi.org/10.1126/science.1261689>
203. Paolesse, R., Nardis, S., Monti, D., Stefanelli, M., Natale, C.D. (2017). Porphyrinoids for chemical sensor applications. *Chemical Reviews*, 117(4), 2517–2583. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00361>
204. Watson, J., Ihokura, K. (1999). Gas-sensing materials. *MRS Bulletin*, 24(6), 14–17. <https://doi.org/10.1557/S0883769400052453>
205. Poghosian, A., Lüth, H., Schultze, J.W., Schöning, M.J. (2001). (Bio-) chemical and physical microsensor arrays using an identical transducer principle. *Electrochimica Acta*, 47(1–2), 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(01\)00562-X](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(01)00562-X)
206. Pirondini, L., Dalcaneale, E. (2007). Molecular recognition at the gas–solid interface: A powerful tool for chemical sensing. *Chemical Society Reviews*, 36(5), 695–706. <https://doi.org/10.1039/b516256b>
207. Ariga, K., Hill, J.P., Endo, H. (2007). Developments in molecular recognition and sensing at interfaces. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(8), 864–883. <https://doi.org/10.3390/i8080864>
208. Mu, B., Zhang, J., McNicholas, T.P., Reuel, N.F., Kruss, S., Strano, M.S. (2014). Recent advances in molecular recognition based on nanoengineered platforms. *Accounts of Chemical Research*, 47(4), 979–988. <https://doi.org/10.1021/ar400162w>

AUTHOR INFORMATION		СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	
Affiliation		Принадлежность к организации	
Dongjie Luo , Bachelor, College of Engineering, China Agricultural University Beijing, 100083, PR China Tel.: +86–1305–120–91–54 E-mail: dongjieluo@163.com ORCID: http://orcid.org/0009-0003-4649-021X		Лую Дунцзе — бакалавр, Инженерный колледж, Китайский сельскохозяйственный университет 100083, Китайская Народная Республика, Пекин Тел.: +86–1305–120–91–54 E-mail: dongjieluo@163.com ORCID: http://orcid.org/0009-0003-4649-021X	
Marina A. Nikitina , Doctor of Technical Sciences, Docent, Leading Scientific Worker, the Head of the Direction of Information Technologies of the Center of Economic and Analytical Research and Information Technologies, V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia. Tel: +7–495–676–95–11 extension 297 E-mail: m.nikitina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8313-4105		Никитина Марина Александровна — доктор технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, руководитель направления Центра экономико-аналитических исследований и информационных технологий, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, Талалихина, 26 Тел.: +7–495–676–95–11 (297) E-mail: m.nikitina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8313-4105	
Xinqing Xiao , Doctor of Engineering, Associate Professor, Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, College of Engineering, China Agricultural University Beijing, 100083, PR China. Tel.: +86–158–0122–7781 E-mail: xxqjd@cau.edu.cn ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9512-4000 * corresponding author		Сяо Синьцин — доктор технических наук, научный сотрудник, Пекинская лаборатория качества и безопасности пищевых продуктов, Инженерный колледж, Китайский сельскохозяйственный университет 100083, Китайская Народная Республика, Пекин Тел.: +86–158–0122–7781 E-mail: xxqjd@cau.edu.cn ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9512-4000 * автор для контактов	
Contribution		Критерии авторства	
Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.		Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	
Conflict of interest		Конфликт интересов	
The authors declare no conflict of interest.		Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-531-538>

Поступила 30.07.2023

Поступила после рецензирования 12.12.2023

Принята в печать 15.12.2023

© Ситникова П. Б., Казакова Н. В., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

Open access

ОБОСНОВАНИЕ, НАПРАВЛЕНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В ПРОИЗВОДСТВЕ МОРОЖЕНОГО

Ситникова П. Б.*, Казакова Н. В.

Всероссийский научно-исследовательский институт холодильной промышленности, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

мороженое,
концентрат,
изолят, гидролизат,
сывороточный белок

Дефицит белка является важной мировой проблемой. Дополнительным источником белка может стать побочный продукт производства сыра и творога — сыrovотка. В обзоре обоснована целесообразность использования молочной сыrovотки в пищевых целях, обусловленная ее составом и биологической ценностью. Кроме того, применение сыrovотки в качестве продукта питания снижает угрозу загрязнения окружающей среды, возникающую при утилизации ее в канализацию. Целью данной статьи является сбор, анализ и обобщение данных о применении сыrovотки и продуктов ее переработки в технологии мороженого и взбитых замороженных десертов. Приведен анализ данных Международной молочной федерации (ММФ) о мировых объемах производства молочной сыrovотки, а также о количестве высокоценного белка, которому они эквивалентны. Проанализирован современный мировой опыт технологий переработки молочной сыrovотки и ассортимента продуктов, получаемых в результате их использования. Акцентируется внимание на характеристике и свойствах продуктов переработки молочной сыrovотки (концентраты, изоляты, гидролизаты молочных, в первую очередь, сыровоточных белков) и мицеллярного казеина. Оценен и обобщен опыт исследований возможности их использования в производстве мороженого и в других пищевых продуктах. Рассмотрено влияние указанных продуктов на технологические, структурно-механические, микроструктурные, органолептические показатели мороженого и его биологическую ценность. Отмечено наличие как положительного, так и отрицательного опыта применения молочных, включая сыровоточные, белков на потребительские характеристики замороженных продуктов. Обоснована необходимость более детального изучения результатов использования каждого определенного источника молочного белка применительно к конкретным видам мороженого и взбитых замороженных десертов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию FGUS-2022–0013 ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН.

Received 30.07.2023

Accepted in revised 12.12.2023

Accepted for publication 15.12.2023

© Sitnikova P. B., Kazakova, N. V., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

Open access

SUBSTANTIATION, DIRECTIONS AND RESULTS OF USING WHEY PROCESSED PRODUCTS IN ICE CREAM PRODUCTION

Polina B. Sitnikova,* Natalia V. Kazakova

All-Russian Scientific Research Institute of Refrigeration Industry, Moscow, Russia

KEY WORDS:

ice cream, concentrate,
isolate, hydrolyzate,
whey protein

ABSTRACT

The deficiency of protein is an important global problem. Whey, as a by-product of the production of cheese and cottage cheese, can be an additional source of protein. The feasibility of using whey for food purposes due to its composition and biological value is substantiated in the review. Besides, the usage of whey for food purposes reduces threat of environmental pollution existing when disposing it into the sewer. The aim of the article was to collect, analyze and summarize data on the use of whey and products of its processing in the technology of ice cream and whipped frozen desserts. The analysis of the data of the International Dairy Federation (IDF) on the global volumes of milk whey production as well as the amount of high-value protein, to which they are equivalent, is given. The modern world experience in processing technologies of whey and the product assortment made with its usage has been analyzed. Attention is concentrated on the characteristics and properties of whey processed products (concentrates, isolates, milk hydrolysates, first of all, whey proteins) and micellar casein. The research experience in studying the possibility of their use in the production of ice cream and other foods is assessed and summarized. The influence of these products on the technological, structural-mechanical, microstructural and organoleptic characteristics of ice cream and on its biological value is considered. The presence of positive and negative experience in the usage of dairy proteins, including whey proteins, on the consumer characteristics of frozen food is noted. The necessity of more detailed study of results of using each particular source of milk protein in relation to different types of ice cream and whipped frozen desserts is substantiated.

FUNDING: The article was prepared as part of the research under the state assignment No. FGUS-2022–0013 of the V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Ситникова, П. Б., Казакова, Н. В. (2023). Обоснование, направления и результаты использования продуктов переработки молочной сыrovотки в производстве мороженого. *Пищевые системы*, 6(4), 531–538. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-531-538>

FOR CITATION: Sitnikova, P. B., Kazakova, N. V. (2023). Substantiation, directions and results of using whey processed products in ice cream production. *Food Systems*, 6(4), 531–538. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-531-538>

1. Введение

В рамках XXIII Петербургского международного экономического форума (ПМЭФ) руководитель Роспотребнадзора Анна Попова отметила, что в рационе россиян дефицит белка составляет в среднем 11,5%¹, а по данным «ФИЦ питания и биотехнологии», ежегодный дефицит пищевого белка в России превышает 1 млн т. Снижение потребления белка в пищу обусловлено недостаточной обеспеченностью населения Земли данным питательным веществом. Общий дефицит белка на планете оценивается в 10–25 млн т в год. При этом, по данным Международной молочной федерации (ММФ), в мире производится до 130 млн т молочной сыворотки, что эквивалентно более 800 тыс. т высокоценного белка [1].

В России ежегодные объемы подсырной сыворотки во много раз превышают объемы ее последующего использования в пищевых целях. Вместе с тем в последние годы мировая рыночная стоимость сывороточных белков ежегодно увеличивается в среднем на 4% [2,3]. Это обусловлено развитием индустрии производства и популяризацией применения сывороточных продуктов в спортивном питании, молочной продукции и других пищевых продуктах. В России в производстве продуктов питания используется 48% вырабатываемой сухой сыворотки, а в качестве корма для сельскохозяйственных животных — 52%². На выпуск продуктов детского питания тратится более 75% объема производимой деминерализованной сыворотки, 54% объема концентрата сывороточного белка. Изолят сывороточного протеина применяется в спортивном питании и в медицине [4].

Совершенствование биотехнологических процессов переработки побочных сырьевых ресурсов, к которым относится сыворотка, является приоритетной стратегической задачей и коррелируется с направлениями Стратегии развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации на период до 2030 года³. В документе подчеркивается необходимость внедрения новых технологий, в том числе биотехнологий, позволяющих значительно расширить ассортимент продуктов нового поколения с заданными качественными характеристиками.

Необходимость переработки молочной сыворотки с целью дальнейшего использования также обусловлена стремлением производителей к минимизации антропогенного загрязнения окружающей среды, связанного с ее утилизацией в канализацию. Сыворотка обладает крайне высокими значениями показателей биохимического и химического потребления кислорода: БПК — 40–60 мг/л, ХПК — 50–80 мг/л. По литературным данным [5,6], антропогенный вред, вызванный неконтролируемым выбросом сыворотки, в 100–175 раз превышает аналогичные показатели вредоносного воздействия бытовых сточных вод.

2. Материалы и методы

Поиск научной литературы проводился с использованием поисковых систем Web of Science, Scopus и Google Scholar, при помощи научных электронных библиотек «КиберЛенинка», eLIBRARY, а также по открытым интернет-источникам. Сбор данных осуществлялся на русском и английском языках по ключевым фразам со включением оператора «и»: «мороженое», «концентрат сывороточного белка», «концентрат молочного белка», «изолят сывороточного белка», «изолят молочного белка», «гидролизат сывороточного белка», «гидролизат молочного белка», «молочный белок», «сывороточный белок», «мицеллярный казеин», «молочная сыворотка», «творожная сыворотка», «подсырная сыворотка». По поисковому запросу было найдено более 3 500 источников.

В ходе работы были проанализированы полные тексты статей, соответствующих критериям поиска. Статьи, не относящиеся к теме исследования, отклоняли после изучения названия и аннотации.

Критерии включения публикации:

1. Публикация создана в период 2015–2023 гг.;
2. Источник проиндексирован в Web of Science, Scopus или РИНЦ;

¹ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (2019). Руководитель Роспотребнадзора Анна Попова в рамках ПЭМФ представила федеральный проект «Здоровое питание» и провела панельную сессию с представителями органов власти, научного сообщества и руководителями крупнейших российских и зарубежных компаний. Получено с https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=12067. Дата обращения 06.07.2023 г.

² Новости и аналитика молочного рынка (2019) 10 графиков о состоянии рынка молочной сыворотки. Получено с <https://milknews.ru/analitika-rinka-moloka/rinok-moloka-v-Rossii/grafiki-syvorotka-rf.html>. Дата обращения 06.07.2023

³ Стратегии развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации на период до 2030 года (Распоряжение Правительства РФ № 559-р)

3. Возможно выборочное включение статей, опубликованных ранее 2015 г. в случае отсутствия новых источников по заданным критериям поиска.

Критерии исключения:

1. Публикации, вышедшие ранее 2000 г.;
2. Работы, не относящиеся к теме исследования;
3. Отсутствие полных текстов публикаций.

3. Биологическая ценность и технологическая функциональность молочной сыворотки и продуктов ее переработки

В молочной сыворотке, являющейся побочным продуктом переработки молока при производстве сыра, творога или казеина, остается около 50% сухих веществ молока-сырья, из которых на долю сывороточных белков приходится от 0,7 до 0,9%. Биологическая ценность сывороточных белков обусловлена наличием в их составе 8 незаменимых аминокислот (из 18 известных), биоактивных пептидов и многообразием функций, которые они выполняют в организме человека. К последним относятся такие функции, как иммуностимулирование, понижение холестерина в крови, участие в синтезе гормонов и ферментов [7–9]. Низкий гликемический индекс сывороточных белков позволяет оптимизировать выделение инсулина, регулируя уровень глюкозы в крови и тем самым предотвращая возникновение диабета 2-го типа [10]. Кроме того, аминокислотный состав сывороточных белков наиболее близок к аминокислотному составу мышечной ткани человека [11]. Совокупность указанных характеристик сывороточных белков обуславливает целесообразность их использования в качестве функциональных пищевых ингредиентов в пищевых продуктах [2,12,13].

Биологическая ценность казеина, в отличие от сывороточных белков, несколько ограничивается дефицитом серосодержащей аминокислоты цистина. Кроме того, казеин содержит большое количество фенилаланина, тирозина и метионина, что затрудняет его метаболизм в организме у грудных детей [14].

Помимо биологической ценности сывороточных белков, для производителей пищевых продуктов представляют не меньший интерес и технологические функциональные свойства указанных компонентов. Основные из них — растворимость, способность к диспергированию, гелеобразованию, повышению вязкости продукта и к формированию текстуры, характерной для продуктов с более высокой массовой долей жира [2,15].

По мнению авторов [10], одной из важных физико-химических характеристик препаратов сывороточных белков при производстве функциональных напитков является диспергируемость. Она зависит от способа получения препарата и характеризует его способность к смачиванию, набуханию и дальнейшему переходу в раствор. Как правило, изоляты и гидролизаты сывороточных белков обладают более высокой диспергируемостью по сравнению с концентратами.

Растворы концентратов сывороточных белков образуют гели при концентрации белка более 8–10% и при нагревании до температуры 80–85 °C и выше. Прочность геля возрастает с увеличением ионной силы и pH с 4,5 до 7,5. Исключительно высокой способностью к гелеобразованию обладают изоляты сывороточных белков: они переходят в студнеобразное состояние при температуре 56–58 °C и pH 7–9 [16]. По данным Токаева и соавторов [10], вязкость препаратов самих сывороточных белков зависит от условий и технологии их получения. Концентраты и изоляты сывороточных белков, полученные ультра- и нанофильтрацией, имеют сравнительно низкую вязкость (для 1%-го раствора около 1·10⁻³ Па·с). Увеличение концентрации раствора до 10% влечет за собой повышение вязкости до (3–5)·10⁻³ Па·с. Вязкость растворов гидролизатов сывороточных белков существенно ниже по сравнению с концентратами и изолятами и не превышает 1,5·10⁻³ Па·с в диапазоне концентрации раствора от 1,0 до 10% [10].

Сывороточные белки за счет способности к пенообразованию положительно влияют на формирование и стабильность воздушной фазы во взбитых пищевых продуктах, изменяя межфазное поверхностное натяжение и повышая способность продуктов к насыщению воздухом [17–19]. Помимо указанного, белки, в том числе сывороточные, участвуют в формировании оболочек жировых шариков, присутствующих в жиросодержащих пищевых продуктах, и тем самым способствуют дополнительной стабилизации воздушной фазы и формированию структуры продукта [20–22].

Эмульгирующие свойства сывороточных белков ниже по сравнению со свойствами казеина. Вместе с тем концентраты сывороточных белков, полученные из подсырной и солянокислой казеиновой сыворотки, имеют эмульгирующую способность, почти не уступающую способности яичного белка. Так, в 100 мл 0,1%-го раствора белкового концентрата может быть эмульгировано от 34 до 42 г жира [23].

Перечисленные биологические и технологические функциональные свойства сывороточных белков востребованы и в технологии мороженого.

4. Продукты переработки молочной сыворотки, способы их получения и состав

В настоящее время при производстве мороженого [20,24] часть сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО) заменяют сухой подсырной сывороткой или концентратами сывороточных и молочных белков, что обусловлено экономической целесообразностью. При этом сухая подсырная сыворотка по сравнению с другими источниками молочных белков содержит меньше белка (не менее 10,0%) и больше молочного сахара — лактозы (не менее 70,0%)⁴. Эти характеристики ограничивают возможности ее применения в производстве мороженого, влияя на его органолептические показатели, а также на формирование и сохранение структуры продукта в процессе холодильного хранения.

Альтернативой использованию молочной сыворотки в качестве источника молочного белка является применение таких продуктов ее переработки, как концентраты, изоляты, гидролизаты молочных белков, включая сывороточные, а также мицеллярный казеин [4,25–29].

В соответствии с национальным стандартом РФ⁵, сухие концентраты сывороточных белков в зависимости от массовой доли белка подразделяют на продукты марок КСБ-УФ-40, КСБ-УФ-60, КСБ-УФ-80 с массовой долей белка в сухом веществе не менее 40,0, 60,0 и 80,0% и с массовой долей лактозы не менее 47,0, 28,0 и 8,0% соответственно. Указанное соотношение белка и лактозы делает применение концентрата сывороточных белков более выгодным с технологической точки зрения, нежели использование сухой сыворотки. Кроме того, биологическая ценность сухой подсырной сыворотки составляет 34,51%, КСБ-70 из подсырной сыворотки — 49,6%, КСБ-70 из казеиновой сыворотки — 47,5% [1,30]. Концентраты сывороточных белков хорошо растворимы в воде, что, наряду с вышеперечисленными свойствами, позволяет применять их в качестве белковых обогаителей для повышения биологической ценности молочных, мясных, кондитерских, хлебобулочных и других пищевых продуктов, а также использовать в роли стабилизаторов структуры мороженого, низкожирной сметаны, кефира и т. д. [30].

Массовая доля белка в концентратах молочных белков составляет не менее 80%, в изолятах молочных и сывороточных белков — от 97,0 до 97,5%, в гидролизатах — от 60,0 до 90,0%, в мицеллярном казеине — от 70,0 до 85,5% [25,29,31].

Белки концентратов и изолятов сывороточных белков представлены в основном фракциями α -лактальбумина и β -лактоглобулина, а концентраты и изоляты молочных белков — казеином и сывороточными белками как в том же соотношении, что и в молоке, так и в измененном [26,32,33]. Казеин в концентратах молочных белков присутствует в мицеллярной форме, которая похожа на форму казеинов в молоке, а сывороточные белки находятся в нативной или денатурированной форме [34].

Изоляты сывороточных белков характеризуются высокой концентрацией аминокислот с разветвленными боковыми цепочками, которые преобладают в метаболизме мышечной ткани [31].

В гидролизатах сывороточных белков, полученных методом ферментативного гидролиза, наряду с α -лактальбумином и β -лактоглобулином присутствуют необходимые организму аминокислоты, в том числе незаменимые (триптофан, фенилаланин и тирозин, лизин, валин, изолейцин, треонин, метионин и цистеин). Это способствует приданию функциональных свойств пищевому продукту, при выработке которого они используются [14]. В результате гидролиза белки расщепляются на мелкие фракции, благодаря чему гидролизаты сывороточных белков характеризуются пониженной аллергенностью, по сравнению с белками молока [35], в связи с чем широко применяются в гипоаллергенных продуктах специального назначения [10].

Концентраты сывороточных белков получают преимущественно удалением минеральных веществ и лактозы из сыворотки различными методами обработки сырья: ультрафильтрацией, электродиализом, ионным обменом или кристаллизацией лактозы с дальнейшей сушкой [25]. Концентраты молочных белков выделяют ультрафильтрацией и диализацией молока с последующим выпариванием и высушиванием на сушилах преимущественно распылительного типа [25]. Изоляты сывороточных белков получают методом ионного обмена

или микрофильтрации молочной сыворотки. Изоляты молочного белка производят посредством осаждения белков казеина и сыворотки из обезжиренного молока методом диализации. Гидролизаты сывороточных белков вырабатывают путем кислотного или ферментативного гидролиза молочной сыворотки. Глубина ферментативного гидролиза составляет 41,0–72,0% от общего содержания белка [14].

Мицеллярный казеин выделяют из молока в процессе многоэтапной физической фильтрации с использованием специальных микропористых мембран, что позволяет очистить казеиновый мицеллий и отделить его от других компонентов, присутствующих в исходном сырье. Мицеллярный казеин содержит от 70,0% до 85,5% белка [29].

4.1. Концентраты сывороточных и молочных белков

По имеющимся литературным данным [25,30], наиболее широко изученной и востребованной пищевой промышленностью формой молочных белков являются концентраты молочных и сывороточных белков, что обусловлено присущим им рациональным соотношением цены и качества.

Применение концентратов и изолятов молочных белков ограничивается, с одной стороны, дефицитом в казеине серосодержащей аминокислоты цистина, что снижает их биологическую ценность, с другой — высоким содержанием фенилаланина, тирозина и метионина, что вызывает проблемы при метаболизме у грудных детей [14]. Казеин хуже растворим в воде, его коллоидные растворы труднее поддаются сгущению и сушке, нежели растворы сывороточных белков. Поэтому стоимость источников казеина, к которым, наряду с концентратами и изолятами молочных белков, относится мицеллярный казеин, более высокая.

В связи с вышеизложенным, объем информационных данных о целях, возможностях и результатах применения концентратов сывороточных белков в производстве пищевых продуктов, в частности мороженого, доминирует над количеством публикаций, отражающих указанные аспекты применительно к другим источникам молочных белков.

В литературе имеются сведения об использовании и рекомендуемых дозировках концентратов сывороточных белков для повышения пищевой ценности, влияния на структурно-механические и органолептические характеристики продуктов питания, включая низкожирные. Так, в публикации [30] приведена информация о возможности применения концентратов сывороточных белков как белковых обогаителей, способных повысить биологическую ценность молочных, мясных, кондитерских, хлебобулочных и других пищевых продуктов, а также в качестве стабилизаторов структуры мороженого, низкожирной сметаны, кефира и других продуктов.

В работе [34] представлены результаты исследований фракционного состава молочного-белковых концентратов «Неопролакт У (1)» и Promilk Карпа Optimum 85. Определено, что «Неопролакт У (1)» содержит 3 фракции сывороточных белков (α -лактальбумин, β -лактоглобулин и иммуноглобулин) и 3 фракции казеина (α s1-казеин, α s2-казеин, β -казеин). Promilk Карпа Optimum 85 включает в себя 2 фракции сывороточных белков (α -лактальбумин и β -лактоглобулин) и 2 фракции казеина (α s1-казеин, α s2-казеин). Рассчитаны абсолютные значения фракций сывороточных белков и казеина [36].

Физико-химические, структурно-механические и микроструктурные показатели мороженого с применением концентрата белка Nutrilac СН-7611 приведены в работе [37]. Установлено, что мороженое с указанным концентратом по органолептическим свойствам не уступает мороженому с высоким содержанием жира, обладает вдвое меньшей калорийностью и высокой биологической ценностью.

Авторы [38] разработали композиционный состав обезжиренного мороженого. Использование концентратов сывороточных белков совместно с инулином позволяет компенсировать органолептические ощущения отсутствия жира в мороженом. Помимо этого, указано, что внесение концентрата сывороточных белков в количестве 2,0% в мороженое с низкой массовой долей жира обеспечивает за счет белка не менее 20% его энергетической ценности. Это позволяет наносить на упаковку продукта дополнительную информацию, говорящую о высоком содержании белка в продукте.

В работе [39] рассмотрен аспект применения концентратов сывороточных белков для восполнения количества сухих веществ, недостаток которых обусловлен заменой в мороженом сахарозы глюкозно-фруктозным сиропом. Указанный прием позволил снизить количество добавленного сахара в продукте на 10,0%, калорийность — на 12,0%, гликемический индекс — в 1,5 раза.

По данным тех же авторов статьи [40], внесение 3,0% концентрата сывороточных белков в мороженое приводит к повышению его биологической ценности на 15,0%.

⁴ ГОСТ 33958–2016 «Сыворотка молочная сухая. Технические условия». М.: Стандартинформ, 2019. — 12 с.

⁵ ГОСТ Р 53456–2022 «Концентраты сывороточных белков сухие. Технические условия». М.: Стандартинформ, 2022. — 10 с.

В патенте № 2661396 С1, полученном ООО «Йошкар-Олинским Хладокомбинатом», автор Танерова Л. Н. [41] предложила способ производства и состав белкового мороженого. Задача изобретения заключалась в том, чтобы получить мороженое функционального назначения с высоким содержанием белка, обогащенное витаминами А, В, Е, низкокалорийное, без сахара, консервантов, глутена и сои, которое подходит для потребления пациентами с инсулинозависимым сахарным диабетом и спортсменами в целях набора мышечной массы. В рецептуре одновременно присутствуют: концентрат сывороточных белков — от 8,0 до 9,0%; концентрат молочных белков — от 6,9 до 7,9%; молоко цельное — от 33,0 до 38,0%; масло сливочное — от 0,1 до 0,5%.

Работа [42] посвящена исследованию влияния на характеристики мороженого с массовой долей жира 5% использования сывороточных белков в композиции с трансглутаминазой. В статье указано, что применение названных ингредиентов позволяет увеличить вязкость смеси для мороженого, улучшив тем самым структурно-механические характеристики мороженого с невысокой массовой долей жира и его термоустойчивость.

В публикации [43] представлены результаты исследования характеристик мороженого с массовой долей жира 8,0%, СОМО 10,0% и с дополнительным внесением в рецептуру 1,0–5,0% концентрата сывороточных белков. Установлено, что включение в состав мороженого концентрата сывороточных белков в указанных количествах приводит к повышению титруемой кислотности в 1,1–1,9 раза и динамической вязкости смесей в 1,2–2,9 раза. Скорость таяния мороженого при этом снижается в 3 раза через 60 мин выдержки. В ходе эксперимента установлено, что внесение в мороженое от 1,0 до 3,0% концентрата сывороточных белков приводит к повышению дисперсности кристаллов льда и воздушной фазы, к улучшению характеристик текстуры мороженого, в том числе к снижению его твердости в 1,4–8,3 раза, и к формированию полноты сливочного вкуса. Однако дальнейшее увеличение массовой доли концентрата сывороточных белков способствует снижению количества воздушных пузырьков с размером до 50 мкм, что является нежелательным фактором. Таким образом, обоснована нецелесообразность использования в продукте более 3,0% концентрата сывороточных белков.

Авторы [44] изучили возможность замены в мороженом от 1,0 до 4,0% СОМО на концентраты сывороточных белков. Установлено, что по мере повышения массовой доли концентратов сывороточных белков возрастает вязкость, кислотность и взбитость смеси для мороженого, что обусловлено увеличением массовой доли белка в продукте. По результатам исследований рекомендована замена не более 3,0% СОМО на концентраты сывороточных белков.

В работе [45] также обосновано использование с целью обогащения мороженого концентратов сывороточных белков в количестве не более 3,0%. Отмечено, что внесение 1,0, 2,0 и 3,0% концентратов сывороточных белков приводит к нарастанию вязкости смеси для мороженого в 1,65, 1,8 и 2,48 раза соответственно. Оказывает положительное влияние на термоустойчивость мороженого и дисперсность кристаллов льда в продукте, размер которых по окончании 3 месяцев хранения не превышал 34 мкм. При этом констатируется нецелесообразность превышения массовой доли общего белка в мороженом более 6,5%, так как это приводит к чрезмерному увеличению вязкости смеси для мороженого.

В публикации [46] изучено влияние концентрата молочных белков, полученного методом нанофильтрации (НФ-концентрат), на состояние и дисперсность воздушной фазы мороженого. Отмечено, что по мере увеличения массовой доли СОМО, заменяемой на НФ-концентраты, средний диаметр воздушных пузырьков уменьшается и не превышает 44 мкм. Максимальная площадь поверхности воздушных пузырьков зафиксирована в образце со степенью замены 20% СОМО. Дальнейшие исследования свидетельствуют о том, что замена 20 и 30% СОМО на НФ-концентрат не приводит к существенному изменению органолептических свойств мороженого относительно контрольного образца, а замена 50,0% СОМО приводит в продукт нежелательный «сывороточный» привкус.

По данным [19], введение 3,0% концентрата сывороточных белков во взбитые замороженные кисломолочные десерты позволяет повысить вязкость смеси для их выработки в 4,4 раза, а взбитость — в 1,4 раза. Отмечено также положительное влияние концентрата сывороточных белков на стабильность воздушной фазы десертов при их длительном холодильном хранении.

В статье [11] нашли отражение результаты исследований мороженого с повышенным содержанием белка и углеводов за счет использования композиции концентрата сывороточных белков и мальтодекстрина. Авторами отмечено, что образец мороженого

с применением КСБ-80 обладал гармоничным вкусом и сбалансированной консистенцией.

Результаты эксперимента по оптимизации рецептуры мороженого с использованием белковых обогаителей (сывороточных белков) представлены в публикации [47]. В ходе исследований проведено симплекс-решетчатое планирование эксперимента, в результате которого найдены оптимальные соотношения молочных компонентов в рецептуре продукта: сухого и сгущенного молока — 8,7% и 5,1% соответственно, белкового обогаителя — 1,3%. Приготовленное в результате эксперимента мороженое характеризовалось хорошими органолептическими показателями, взбитостью 64,4% и высоким показателем биологической ценности — 61,92%.

Структуру мороженого с низкой массовой долей жира стабилизировали путем использования композиции камеди семян лаллемантии королевской (балангу ширази) и концентрата сывороточных белков [48]. В процессе работы был сделан вывод о том, что применение комплекса из 0,4% камеди и 5,0% концентрата сывороточных белков позволяет при низкой массовой доле жира в продукте имитировать органолептические и структурно-механические характеристики мороженого с более высокой массовой долей жира.

В публикации [26] представлены данные о влиянии концентратов белков на реологические показатели йогурта. Установлено, что внесение концентрата сывороточных белков позволяет повысить влагоудерживающую способность продукта до 80%. Наибольшая динамическая вязкость 19,3 Па·с и наибольшее значение когезии 0,4 Н·с зафиксированы в образце с концентратом сывороточных белков.

Показана возможность применения КСБ-УФ в технологии производства низкожирной сметаны [30]. Для промышленного внедрения рекомендована рецептура сметаны с массовой долей жира 10%, в состав которой входит 0,6% концентрата сывороточных белков.

В работе [49] представлены результаты исследований применения концентрата молочных белков с массовой долей белка 56% и 85% в качестве заменителей СОМО в смеси для мороженого. Отмечено, что массовая доля белка остается одинаковой в мороженом, при этом массовую долю сухих веществ дополняют полидекстрозой до одинаковых значений во всех исследуемых образцах. В результате установлено, что смеси для мороженого с концентратом молочных белков обладают более высокой вязкостью, большей степенью дестабилизации жира и лучше сохраняют форму порции.

Наряду с положительными результатами исследований и с выводами о рациональности использования концентратов сывороточных и молочных белков, в литературе встречаются экспериментально подтвержденные заключения противоположного характера. Так, в публикации [50] отмечено, что цветовая и вкусовая характеристики концентратов часто являются ограничивающими факторами для более широкого применения концентратов сывороточных белков в молочном производстве и не позволяют использовать значимые их количества (не более 1%) во избежание негативного влияния на качество самого продукта. В работах [17,18,38,43,51] указывается на то, что присутствие концентратов сывороточных белков в составе пищевых продуктов не всегда положительно влияет на пенообразующую способность смесей, на эмульгирующую способность белков и на динамику кристаллообразования в мороженом.

В статье [20] приведены результаты изучения последствий применения концентрированных форм молочного и сывороточного белков с целью повышения содержания белка в мороженом пломбир при одновременном снижении затрат на сырье. В качестве источника белка рассматривался концентрат сывороточных белков марки WPC80 Mlekovita с массовой долей белка не менее 80%. В результате исследований отмечено, что вязкость смесей при применении концентрата сывороточных белков снижалась в 2 раза, а средний диаметр воздушных пузырьков увеличивался в 1,23–1,26 раза.

В работе [22] указано, что при использовании концентратов сывороточных белков с массовой долей белка 65% и 80% наблюдалось снижение взбитости и повышение твердости мороженого.

В публикации [24] установлено отрицательное влияние замены СОМО сухими веществами подсырной сыворотки на динамическую вязкость смеси, термоустойчивость, дисперсность воздушной фазы и органолептические показатели мороженого с заменой 50% СОМО. Однако при этом отмечается, что доля белка в мороженом в эксперименте увеличилась с 3,4 до 5,9%; доля лактозы снизилась с 5,4 до 3,2%; доля минеральных веществ уменьшилась с 0,9 до 0,45%.

В статье [11], отражающей результаты экспериментов по повышению содержания белка и углеводов в мороженом посредством использования композиции концентрата сывороточных белков и мальтодекстрина, авторами отмечено, что образец мороженого

с применением КСБ-35 обладал слабой, льдистой структурой и характеризовался наличием крупных кристаллов льда.

4.2. Изоляты и гидролизаты сывороточных белков

Помимо информации о функциональных свойствах и возможностях применения концентратов сывороточных белков в производстве пищевых продуктов, в том числе мороженого, в литературе присутствуют сведения об аналогичных аспектах исследований применительно к другим продуктам переработки сыворотки. Так, в публикации [52] приведены результаты экспериментов по подбору оптимальной дозировки изолята сывороточных белков для использования в замороженном молочном десерте. Количество изолята сывороточных белков в эксперименте варьируется от 10 до 25% от массы молока. Установлено, что оптимальное содержание изолята сывороточных белков составляет не более 20% от массы молока. Замороженный десерт с указанной массовой долей изолята сывороточных белков обладает приятным вкусом и ароматом. Отмечено, что в нем отсутствуют крупные кристаллы льда. При превышении указанной дозировки наблюдают снижение растворимости изолята сывороточных белков, чрезмерное увеличение вязкости смеси для десерта, уменьшение взбитости продукта, формирование мучнистой консистенции, наличие горького привкуса и выраженного запаха сыворотки. Снижение дозировки изолята сывороточных белков до 10% приводит к формированию десерта со слабовыраженным вкусом и льдистой структурой.

Использование изолята сывороточных белков при изготовлении замороженных десертов повышенной пищевой ценности, предназначенных для употребления посетителями фитнес-клубов, вызывает увеличение динамической вязкости смесей для их производства и взбитости продукта [4]. Аналогичный эффект наблюдается и при внесении изолята сывороточных белков в состав йогуртов, о чем свидетельствует улучшение реологических характеристик, а именно твердости, липкости, разжевываемости, упругости и клейкости готового продукта [26].

В статье [29] приведены результаты применения композиций изолята сывороточных белков и мицеллярного казеина с массовой долей белка 95,0% и 85,5% соответственно в смесях для мороженого. Исследовано 8 комбинаций, отличающихся количественным соотношением источников сывороточного белка. Отобран образец с соотношением мицеллярного казеина и изолята сывороточных белков 20:80. Разработана рецептура мороженого с общей массовой долей сухих веществ 25,4% и с заявленной массовой долей белка 18,0%.

В работе [53] опубликованы выводы о возможности применения изолята сывороточных белков из буйволиного молока в технологии мороженого. В процессе исследования изолятом сывороточных белков заменяли 25, 50, 75 и 100% СОМО. По мере увеличения в продукте массовой доли изолята сывороточных белков массовая доля белка возрастает, а содержание лактозы значительно снижается ($P < 0,05$). Одновременно с этим снижается и сопротивляемость продукта таянию, что отрицательно сказывается на его потребительских свойствах. На основании изложенных в публикации данных автор сделал вывод о том, что максимальная допустимая замена СОМО на изолят сывороточных белков не должна превышать 50,0%.

Авторы [54] исследуют динамическую вязкость, показатели структуры и консистенции сливочного мороженого с массовой долей жира 10% и молочного мороженого с массовой долей жира 6% и 3%. При этом мороженое с массовой долей жира 3% и 6% вырабатывают с добавлением 4% изолята сывороточных белков. Это позволило значительно повысить вязкость смесей для мороженого. Отмечено, что твердость и устойчивость к таянию маложирных образцов мороженого также существенно выросли.

В работе [55] приведены результаты сравнения качественных показателей мороженого, приготовленного с использованием изолята сывороточных белков различных способов гликирования. Гликированный изолят сывороточных белков получают путем инкубации изолята сывороточных белков с D-аллозой, D-психозой, D-глюкозой, D-фруктозой и с другими сахарами при определенных условиях. Отмечено, что все гликированные изоляты сывороточных белков обладают способностью к насыщению воздухом и к образованию пены наравне с нативными изолятами сывороточных белков. Указанная тенденция сохраняется при использовании их в производстве мороженого. Установлено, что изоляты сывороточных белков, гликированные редкими сахарами D-аллозой и D-психозой, обладают высокой антиоксидантной активностью, которая сохраняется при добавлении их в мороженое. В работе сделан вывод, что в результате применения гликированных изолятов сывороточных белков можно получить мороженое хорошего качества с высокой антиоксидантной способностью.

Исследована возможность применения конъюгата к-каррагинана с изолятом молочного белка в качестве стабилизатора в технологии производства мороженого в дозировке 0,1–0,2% [56]. Отмечено, что смеси для мороженого, стабилизированные конъюгатом, показывали более низкие значения по показателям качества текстуры и реологическим показателям, чем механическая смесь к-каррагинана с изолятом молочного белка. Существенных отличий по взбитости и твердости в образцах мороженого не обнаружено. Установлено, что введение конъюгата к-каррагинана с изолятом молочного белка повышает устойчивость образцов мороженого к таянию за счет лучшей влагоудерживающей способности.

Результаты исследования влияния вида и источника белка на микроструктуру и скорость таяния мороженого представлены в статье [57]. Мороженое вырабатывают с применением концентрата молочных белков, изолята сывороточных белков и функциональных белков Procream до концентрации общего белка в продукте 4–10%. Установлено, что значение средних размеров кристаллов льда и воздушных пузырьков, а также взбитость не зависят от источника белка или от его концентрации. Отмечено, что скорость таяния увеличивается с повышением массовой доли белка в продукте, за исключением мороженого с Procream, который обеспечивает высокую устойчивость к таянию во всех образцах.

В статье [58] описано исследование применения изолята сывороточных белков с целью повышения массовой доли белка до 6, 8 и 10% в мороженом из буйволиного молока. Результаты эксперимента показывают, что возрастание массовой доли белка снижает индекс текучести (с 0,86 до 0,57) и повышает коэффициент консистенции (с 0,18 до 4,22 Па·с) смеси для мороженого. При этом отмечено отрицательное влияние увеличения массовой доли белка в продукте на некоторые показатели за счет использования изолята сывороточных белков. Взбитость уменьшается с 94,9 до 33,9%, твердость увеличивается с 13,60 до 47,66 Н, и скорость таяния возрастает с 0,24 до 0,74 г/мл. Сделан вывод о том, что при увеличении массовой доли белка в продукте снижается количество дезмульгированного жира, а также интенсивность образования агломератов жировых шариков.

Не менее активно в настоящее время изучается возможность применения гидролизатов сывороточных белков в продуктах питания. Имеются данные об их использовании в технологии молочных продуктов [59], в том числе йогуртов [60,61], муссов и взбитых десертов [62].

В статье [20] приведены результаты использования гидролизатов сывороточных белков в технологии мороженого пломбир. Отмечено, что вязкость смесей для мороженого и степень дисперсности кристаллов льда при применении гидролизата сывороточных белков повышаются, а термоустойчивость снижается.

Авторы [63] показали, как ферментативно гидролизованный белок улучшает качество структуры продукта по сравнению с нативным белком и влияет на гелеобразующую, пенообразующую, водоудерживающую и эмульгирующую способности.

В патенте RU2708331C2 [64] описан способ производства ягодного десерта с кислородом, обогащенного гидролизатом сывороточных белков с высокой степенью гидролиза (около 60%), в количестве 1–3% от объема сыворотки.

Результаты исследований поверхностно-активных свойств гидролизата казеината натрия и применения его в технологии мороженого взамен гидроколлоида или эмульгатора (Е 472b) с целью формирования чистой этикетки представлены в работе [65]. Автором получен казеинат натрия с низкой степенью гидролиза (2,2–2,4%) [65,66]. Отмечено, что использование гидролизата в качестве гидроколлоида нецелесообразно в связи с негативным влиянием на взбитость и стабильность структуры продукта. Напротив, замена эмульгирующего вещества привела к получению продукта, сравнимого по технологическим и органолептическим показателям со стандартным мороженым.

Изучено влияние гидролизованного нанофильтрованного концентрата ультрафильтрованного пермеата кислой сыворотки на качественные показатели молочного мороженого [67]. В результате работы сделан вывод о том, что кислая сыворотка не влияет на устойчивость мороженого к таянию, но при этом снижает температуру замерзания смеси. При этом отмечено, что криоскопическая температура и температура стеклования (T_g) понижаются по мере увеличения количества кислой сыворотки в мороженом, а гидролизованный нанофильтрованный концентрат ультрафильтрованного пермеата кислой сыворотки может быть использован в мороженом для замены не более 20% сухих веществ молока.

По мнению авторов ряда исследований, ограничивающим фактором применения гидролизатов сывороточных белков в пищевых продуктах является их горький вкус, обусловленный наличием в их составе горьких пептидов [20,65].

5. Заключение

Изложенная информация в целом позволяет сделать вывод о целесообразности применения продуктов переработки молочной сыровотки в целях создания новых видов мороженого, обладающего прогнозируемыми и востребованными на сегодняшний день потре-

бительскими свойствами. Однако это не исключает необходимость более детального изучения аспектов применения в производстве мороженого каждого конкретного источника молочного белка, что обусловлено наличием в научной литературе противоположных результатов исследований одних и тех же изучаемых параметров.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Шаizzo, P. И., Ершова, Л. Д., Павлова, Г. Н., Ермоленко, Р. С., Алехина, Л. А., Варивода, А. А. (2007). Компьютерное моделирование белково-витаминных композиций, сбалансированных по содержанию незаменимых аминокислот. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 6, 62–64.
2. Genovese, A., Balivo, A., Salvati, A., Sacchi, R. (2022). Functional ice cream health benefits and sensory implications. *Food Research International*, 161, Article 111858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111858>
3. Keogh, C., Li, C., Gao, Z. (2019) Evolving consumer trends for whey protein supplements: The Heckman ordered probit estimation. *Agricultural and Food Economics*, 7(1), Article 6. <https://doi.org/10.1186/s40100-019-0125-9>
4. Ландиховская, А. В., Закирова, Р. Р. (29–30 октября, 2019). *Замороженные десерты повышенной пищевой ценности для посетителей фитнес клубов. Сборник научных трудов XIII международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов организаций в сфере сельскохозяйственных наук «Перспективные исследования и новые подходы к производству и переработке сельскохозяйственного сырья и продуктов питания»*, Углич, Россия, 2019.
5. Мельникова, Е. И., Станиславская, Е. Б. (2019). Применение микропартикулат сыровоточных белков в технологии полутвердых сыров. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 4, 129–140. <https://doi.org/10.36107/spfp.2019.199>
6. Ahmad, T., Aadil R. M., Ahmed, H., ur Rahman, U., Soares, B. C. V., Souza, S. L. Q. et al. (2019). Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science and technology*, 88, 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.003>
7. Магомедов, Г. О., Магомедов, М. Г., Рыбина, А. В., Полянский, К. К., Пронина, О. В. (2017). Белковый снэк с концентратом сыровоточного белка для питания спортсменов. *Сырделие и маслоделие*, 5, 32–33.
8. Лосев, А. Н., Мельникова, Е. И., Станиславская, Е. Б., Коротков, Е. Г. (2016). Творог с микропартикулятом сыровоточных белков. *Молочная промышленность*, 1, 31–33.
9. Храмов, А. Г. (2011). Феномен молочной сыровотки. СПб: Профессия, 2011.
10. Токаев, Э. С., Баженова, Е. Н., Мироедов, Р. Ю. (2007). Сыровоточные белки для функциональных напитков. *Молочная промышленность*, 10, 55–56.
11. Зайцев, К. А., Новокшанова, А. Л. (2021). Изучение влияния углеводного компонента на потребительские свойства мороженого. *Ползуновский вестник*, 4, 47–51. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2021.04.007>
12. Patel, S. (2015). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19(A), 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.040>
13. Solak, B. V., Akin, N. (2012). Health benefits of whey protein: A review. *Journal of Food Science and Engineering*, 2(3), 129–137. <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2012.03.001>
14. Просеков, А. Ю., Ульрих, Е. В., Носкова, С. Ю., Будрик, В. Г., Ботина, С. Г., Агаркова, Е. Ю. и др. (2013). Получение ферментативных гидролизатов белков молочной сыровотки с использованием протеолитических ферментов. *Фундаментальные исследования*, 6–5, 108–109.
15. Kew, B., Holmes, M., Stieger, M., Sarkar, A. (2020). Review on fat replacement using protein-based microparticulated powders or microgels: A textural perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 106, 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.032>
16. Гурова, Н. В. (2005) Физико-химические принципы технологий жидких белоксодержащих эмульсионных продуктов для специализированного питания. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук. Москва: МГУПБ, 2005.
17. Loffredi, E., Moriano, M. E., Masseroni, L., Alamprese, C. (2020). Effects of different emulsifier substitutes on artisanal ice cream quality. *LWT*, 137, Article 110499. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110499>
18. Awad, R. A., Hassan, Z. M. R., Salama, W. M. (2014). Surface tension and foaming properties as a simple index in relation to buffalo milk adulteration. *International Journal of Dairy Science*, 9(4), 106–115. <https://doi.org/10.3923/ijds.2014.106.115>
19. Гурский, И. А., Творогова, А. А. (2023). Влияние технологических факторов на воздушную фазу взбитых кисломолочных десертов. *Техника и технология пищевых производств*, 53(1), 1–12. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2410>
20. Творогова, А. А., Шобанова, Т. В., Казакова, Н. В., Канина, К. А. (2022). Влияние частичной замены СОМО концентратами и гидролизатами сыровоточных белков на показатели качества мороженого пломбир. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 3, 138–147. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2022-3-138-147>
21. Творогова, А. А. (2021). Мороженое в России и СССР: теория, практика. Развитие технологий. СПб: Профессия, 2021.
22. Moschopoulou, E., Dernikos, D., Zoidou, E. (2021). Ovine ice cream made with addition of whey protein concentrates of ovine-caprine origin. *International Dairy Journal*, 122, Article 105146. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105146>
23. Горбатова, К. К. (1993). Химия и физика белков молока. М.: Колос, 1993.
24. Творогова, А. А., Шобанова, Т. В., Цеменовский, М. А. (2020). Исследование влияния источников белка на показатели качества мороженого. *Холодильная техника*, 4, 36–39.
25. Володин, Д. Н., Золоторева, М. С., Топалов, В. К., Евдокимов, И. А., Храмов, А. Г., Мертин П. (2015). Переработка молочной сыровотки: понятная стратегия, реальные технологии, адекватные инвестиции, востребованные продукты. *Молочная промышленность*, 5, 36–41.
26. Гурский, И. А. (2023). Текстура обезжиренного йогурта с изолятами и концентратами белков. *Пищевые системы*, 6(1), 29–35. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-29-35>
27. Shinya, I. (2015). Functional and hydration properties of milk protein concentrate (MPC). *Milk Science*, 64(2), 127–137. <https://doi.org/10.11465/milk.64.127> (In Chinese)
28. Tunick, M. H. (2008). Whey protein production and utilization: A brief history. Chapter in a book: *Whey processing, functionality and health benefits*. Hoboken: Wiley-Blackwell (US), 2008. <https://doi.org/10.1002/9780813803845.ch1>
29. Надточий, Л. А., Яковченко, Н. В., Абдуллаева, М. С., Лепешкин, А. И., Кузнецова, Е. Д., Предеина, А. Л. (2016). Разработка технологии и состава высокобелковой смеси мороженого. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств*, 4, 50–57.
30. Варивода, А. А. (2020). Использование концентрата сыровоточных белков в качестве стабилизатора структуры при производстве продуктов питания. *Ползуновский вестник*, 2, 58–62. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.011>
31. Банникова, А. В., Евдокимов, И. А. (2015). Молочные продукты, обогащенные сыровоточными белками. Технологические аспекты создания. *Молочная промышленность*, 1, 64–66.
32. Svanborg, S., Johansen, A., Abrahamsen, R. K., Skeie, S. B. (2015). The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5829–5840. <http://doi.org/10.3168/jds.2014-9039>
33. Uliko, H., Lui, L., Lv, J.-P., Zhang, S.-W. (2016). Functional characteristics of milk protein concentrates and their modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1193–1208. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.758625>
34. Смирнова, И. А., Гутов, Н. Ю., Юрташкина, А. В. (2017). Изучение фракционного состава молочно-белковых концентратов с целью их применения в производстве молочных продуктов. *Техника и технология пищевых производств*, 2(45), 69–74.
35. Неповинных, Н. В., Птичкина, Н. М. (2015). Исследование физико-химических свойств замороженных десертов специального назначения. *Вестник международной академии холода*, 2, 28–31.
36. Смирнова, И. А., Гутов, Н. Ю., Лукин, А. А. (2018). Изучение состава молочно-белковых концентратов. *Техника и технология пищевых производств*, 48(1), 85–90. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-1-85-90>
37. Мельникова, Е. И., Пономарев, А. Н., Попова, Е. Е. (2012). Молочные белки в технологии мороженого. *Молочная промышленность*, 12, 64–65.
38. Ландиховская, А. В. (2021). Разработка композиционного состава и исследование показателей качества низкокалорийного мороженого без сахара. *Пищевые системы*, 4(35), 179–183. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-35-179-183>
39. Ландиховская, А. В., Творогова, А. А., Казакова, Н. В. (2021). Применение глюкозно-фруктозных сиропов в мороженом без сахарозы с низким содержанием жира. *Пищевая промышленность*, 5, 71–74. <https://doi.org/10.52653/PPI.2021.5.5.017>
40. Творогова, А. А., Гурский, И. А., Шобанова, Т. В. (2022). Биологические показатели качества белков обогащенного сливочного мороженого. *Молочная промышленность*, 3, 39–41. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2022-03-39-41>
41. Патент 2661596. Способ производства и состав белкового (протеинового) мороженого / Танерова Л. Н. Опубл. 21.06.2017. Бюлл. № 20.
42. Danesh, E., Goudarzi, M., Jooyandeh, H. (2017). Short communication: Effect of whey protein addition and transglutaminase treatment on the physical and sensory properties of reduced-fat ice cream. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5206–5211. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12537>
43. Гурский, И. А., Творогова, А. А. (2022). Влияние концентратов сыровоточных белков на технологические и органолептические показатели качества мороженого. *Техника и технология пищевых производств*, 52(3), 439–448. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2376>
44. El-Zein, H. M., Moneir, El-Abd M., Mostafa, A. Z., Yasser, El-Gh. F. H. (2016). Effect of incorporating whey protein concentrate on chemical, rheological and textural properties of ice cream. *Journal of Food Processing and Technology*, 07(2), Article 1000546. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000546>
45. Творогова, А. А., Казакова, Н. В. (21–23 июня, 2022). Особенности применения продуктов переработки сыровотки в производстве мороженого. Сборник материалов международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы производства сыра, масла и другой молочной продукции», Углич, ВНИИМС — филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им В. М. Горбатова» РАН, 2022.
46. Шохалова, В. Н., Кузин, А. А., Шохалов, В. А., Костюков, Е. М. (2017). Исследование воздушной фазы мороженого, содержащего НФ-концентрат творожной сыровотки. *Молочнохозяйственный вестник*, 2(26), 130–137.
47. Демина, Е. Н., Березина, Н. А., Казаков, А. В. (2021). Оптимизация рецептуры мороженого методом симплекс-решетчатого планирования. *Хранение и переработка сельскохозяйственного сырья*, 1, 104–116. <https://doi.org/10.36107/spfp.2021.192>

48. Poursani, P., Razavi, S. M. A., Tehrani, M. M., Javidi, F. (2020). Rheological, physical and sensory properties of non-fat ice creams as affected by selected fat replacers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), Article e15010. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15010>
49. Alvarez, V. B., Wolters, C. L., Vodovotz, Y., Ji, T. (2005). Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 862–871. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72752-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72752-1)
50. Баранов, С. (2014). Новое поколение установок микропартикуляции. *Молочная промышленность*, 6, 22–23.
51. E, X., Pei, Z. J., Schmidt, K. A. (2010). Ice cream: Foam formation and stabilization — a review. *Food Reviews International*, 26(2), 122–137. <https://doi.org/10.1080/87559120903564472>
52. Ходырева, З. Р., Шетинин, М. П., Вайтанис, М. А., Щетинина Е. М., Логинова, А. А. (20–24 октября, 2020). Обоснование разработки обогащенного замороженного десерта с добавлением сывороточного белка. Материалы VII Международной научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии. Техника, технология и упаковка для реализации инновационных проектов на предприятиях пищевой и биотехнологической промышленности, Пятигорск, Издательство ПФ СКФУ II. 2020.
53. Awad, R. A., Metwally, A. I. (2000). Evaluation of total milk protein as a milk solids source in ice cream manufacture. *Annals of Agricultural Science (Cairo)*, 45(2), 603–618.
54. Akalin, A. S., Karagözü, C., Ünal, G. (2008). Rheological properties of reduced-fat and low-fat ice cream containing whey protein isolate and inulin. *European Food Research and Technology*, 227, 889–895. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0800-z>
55. Puangmanee, S., Hayakawa, S., Sun, Y., Ogawa, M. (2008). Application of whey protein isolate glycated with rare sugars to ice cream. *Food Science and Technology Research*, 14(5), 457–466. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.457>
56. Seo, C. W., Oh, N. S. (2022). Functional application of Maillard conjugate derived from a κ-carrageenan/milk protein isolate mixture as a stabilizer in ice cream. *LWT*, 161, Article 113406. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113406>
57. Daw, E., Hartel, R. W. (2015). Fat destabilization and melt-down of ice creams with increased protein content. *International Dairy Journal*, 43, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.001>
58. Roy, S., Hussain, S. A., Prasad, W. G., Khetra, Y. (2022). Quality attributes of high protein ice cream prepared by incorporation of whey protein isolate. *Applied Food Research*, 2(1), Article 100029. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2021.100029>
59. Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S. et al. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3235–3241. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>
60. Gómez-Mascaraque, L. G., Miralles, B., Recio, I., López-Rubio, A. (2016). Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. *Journal of Functional Foods*, 26, 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.006>
61. Sakkas, L., Tzevdou, M., Zoidou, E., Gkotsia, E., Karvounis, A., Samara, A. et al. (2019). Yoghurt-type gels from skim sheep milk base enriched with whey protein concentrate hydrolysates and processed by heating or high hydrostatic pressure. *Food*, 8(8), Article 342. <https://doi.org/10.3390/foods8080342>
62. Agarkova, E. Yu., Kruchinin, A. G., Glazunova, O. A., Fedorova, T. V. (2019). Whey protein hydrolysate and pumpkin pectin as nutraceutical and prebiotic components in a functional mousse with antihypertensive and bifidogenic properties. *Nutrients*, 11(12), Article 2930. <https://doi.org/10.3390/nu11122930>
63. Asaithambi, N. Singha, P., Singh, S. K. (2022). Recent application of protein hydrolysates in food texture modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2081665>
64. Патент 2 708 331. Способ производства десерта функционального назначения / Неповинных Н. В., Семина А. И., Новокшанова А. Л., Птичкина Н. М.. Опубл. 05.12.2019. Бюлл. № 34.
65. Ewert, J., Schlierenkamp, F., Fischer, L., Stressler, T. (2019). Application of a technofunctional caseinate hydrolysate to replace surfactants in ice cream. *Chemie Ingenieur Technik*, 91(7), 1024–1031. <https://doi.org/10.1002/cite.201800153>
66. Ewert, J., Gluck, C., Zeeb, B., Weiss, J., Stressler, T., Fischer, L. (2018). Modification of the interfacial properties of sodium caseinate using a commercial peptide preparation from *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Hydrocolloids*, 81, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.036>
67. Vajda, Á., Zeke, I., Juhász, R., Barta, J., Balla, Cs. (2013). Effect of acid whey concentrate on thermophysical properties of milk-based ice-cream. *Acta Alimentaria*, 42(Suppl), 107–115. <https://doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.Supp.13>

REFERENCES

1. Shazzo, R. I., Yerashova, L. D., Pavlova, G. N., Yermolenko, R. S., Alekhina, L. A., Varivoda, A. A. (2007). Computer modelling of the protein-vitamin composites balanced on the contents of irreplaceable amino acids. *Storage and Processing of Farm Products*, 6, 62–64. (In Russian)
2. Genovese, A., Balivo, A., Salvati, A., Sacchi, R. (2022). Functional ice cream health benefits and sensory implications. *Food Research International*, 161, Article 111858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111858>
3. Keogh, C., Li, C., Gao, Z. (2019). Evolving consumer trends for whey protein sports supplements: The Heckman ordered probit estimation. *Agricultural and Food Economics*, 7(1), Article 6. <https://doi.org/10.1186/s40100-019-0125-9>
4. Landihovskaya, A. V., Zakirova, R. R., (October 29–30, 2019). Frozen desserts of the increased nutritional value for visitors of fitness centers. Proceedings of the 13th International scientific-practical conference of young scientists and specialists of organizations in the sphere of agricultural sciences “Promising studies and new approaches to production and processing of agricultural raw materials and food products”, Uglich, Russia, 2019. (In Russian)
5. Melnikova, E. I., Stanislavskaya, E. B. (2019). Application of microparticulates of whey proteins in the technology of semi-hard cheeses. *Storage and Processing of Farm products*, 4, 129–140. <https://doi.org/10.36107/spfp.2019.199> (In Russian)
6. Ahmad, T., Aadil R. M., Ahmed, H., ur Rahman, U., Soares, B. C. V., Souza, S. L. Q. et al. (2019). Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.003>
7. Magomedov, G. O., Magomedov, M. G., Rybina, A. V., Polyanskiy, K. K., Pronina, O. V. (2017). Protein snack with the concentrate of whey protein for sportsmen nutrition. *Cheesemaking and Buttermaking*, 5, 32–33. (In Russian)
8. Losev, A. N., Melnikova, E. I., Stanislavskaya, E. B., Korotkov, E. G. (2016). The curds with whey protein microparticulate. *Dairy Industry*, 1, 31–33. (In Russian)
9. Hramtsov, A. G. (2011). Phenomenon of whey. Saint-Petersburg: Profession, 2011. (In Russian)
10. Tokaev, E. S., Bazhenova, E. N., Miroedov, R. Yu. (2007). Whey proteins for functional drinks. *Dairy Industry*, 10, 55–56. (In Russian)
11. Zaytsev, K. A., Novokshanova, A. L. (2021). Study of the effect of the carbohydrate component on the consumer properties of ice cream. *Polzunovskiy Vestnik*, 4, 47–51. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2021.04.007> (In Russian)
12. Patel, S. (2015). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19(A), 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.040>
13. Solak, B. B., Akin, N. (2012). Health benefits of whey protein: A review. *Journal of Food Science and Engineering*, 2(3), 129–137. <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2012.03.001>
14. Prosekov, A. Y., Ulrhi, E. V., Noskova, S. Y., Budrik, V. G., Botina, S. G., Agarkova, E. Y. et al. (2013). The getting enzymatic whey protein hydrolysate using proteolytic enzyme *Fundamental Research*, 6–5, 1089–1093. (In Russian)
15. Kew, B., Holmes, M., Stieger, M., Sarkar, A. (2020). Review on fat replacement using protein-based microparticulated powders or microgels: A textural perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 106, 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.032>
16. Gurova, N. V. (2003). Physico-chemical principles of technologies of liquid protein-containing emulsion products for specialized nutrition. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Doctor of Technical Sciences. Moscow: Moscow State University of Applied Biotechnology, 2003.
17. Loffredi, E., Moriano, M. E., Masseroni, L., Alamprese, C. (2020). Effects of different emulsifier substitutes on artisanal ice cream quality. *LWT*, 137, Article 110499. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110499>
18. Awad, R. A., Hassan, Z. M. R., Salama, W. M. (2014). Surface tension and foaming properties as a simple index in relation to buffalo milk adulteration. *International Journal of Dairy Science*, 9(4), 106–115. <https://doi.org/10.5923/ijds.2014.106.115>
19. Gurskiy, I. A., Tvorogova, A. A. (2023). The impact of technological factors on the air phase of defrosted fermented-milk desserts. *Food Processing: Techniques and Technology*, 53(1), 1–12. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2410> (In Russian)
20. Tvorogova, A. A., Shobanova, T. V., Kazakova, N. V., Kanina, K. A. (2022). Effect of partial replacement of milk solids non-fat (MSNF) with whey protein concentrates and hydrolysates on the quality parameters of plomieres ice cream. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*, 3, 138–147. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2022-3-138-147> (In Russian)
21. Tvorogova, A. A. (2021). Ice cream in Russia and the USSR: theory, practice, development of technologies. Saint-Petersburg: Profession, 2021. (In Russian)
22. Moschopoulou, E., Dernikos, D., Zoidou, E. (2021). Ovine ice cream made with addition of whey protein concentrates of ovine-caprine origin. *International Dairy Journal*, 122, Article 105146. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105146>
23. Gorbatova, K. K. (1993). Chemistry and physics of milk proteins. Moscow: Kolos, 1993. (In Russian)
24. Tvorogova, A. A., Shobanova, T. V., Tsemenovskiy, M. A. (2020). Study of the effect of protein sources on the ice cream quality indices. *Kholodilnaya Tekhnika*, 4, 36–39. (In Russian)
25. Volodin, D. N., Zolotareva, M. S., Topalov, V. K., Evdokimov, I. A., Hramtsov, A. G., Mertin P. (2015). Milk whey processing: Conceptual strategy, real technologies, adequate investments, demanded products. *Dairy Industry*, 5, 36–41. (In Russian)
26. Gurskiy, I. A. (2023). The texture of non-fat yogurt with proteins isolates and concentrates. *Food Systems*, 6(1), 29–35. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-29-35> (In Russian)
27. Shinya, I. (2015). Functional and hydration properties of milk protein concentrate (MPC). *Milk Science*, 64(2), 127–137. <https://doi.org/10.11465/milk.64.127> (In Chinese)
28. Tunick, M. H. (2008). Whey protein production and utilization: A Brief History. Chapter in a book: *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Hoboken: Wiley-Blackwell (US), 2008. <https://doi.org/10.1002/9780813803845.ch1>
29. Nadtochiy, L. A., Jakovchenko, N. V., Abdullaeva, M. S., Lepeshkin, A. I., Kuznecova, E. D., Predeina, A. L. (2016). Technology and composition of the high-protein mixture for ice cream. *Processes and Food Production Equipment*, 4, 50–57. (In Russian)
30. Varivoda, A. A. (2020). Using whey protein concentrate as a stabilizer of structure in food production. *Polzunovskiy Vestnik*, 2, 58–62. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.011> (In Russian)
31. Bannikova, A. V., Evdokimov, I. A. (2015). Milk products enriched with whey proteins. Technological aspects of developing. *Dairy Industry*, 1, 64–66. (In Russian)
32. Svanborg, S., Johansen, A., Abrahamsen, R. K., Skeie, S. B. (2015). The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5829–5840. <http://doi.org/10.3168/jds.2014-9039>
33. Uliko, H., Lui, L., Lv, J.-P., Zhang, S.-W. (2016). Functional characteristics of milk protein concentrates and their modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1193–1208. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.758625>

34. Smirnova, I. A., Gutov, N. Yu., Yurtashkina, A. V. (2017). Studying of fractional composition of milk-protein concentrates for the purpose of their application in production of dairy products. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2(45), 69–74. (In Russian)
35. Nepovinnikh, N. V., Ptichkina, N. M. (2015). Physicochemical properties of frozen desserts for special purposes. *Journal of International Academy of Refrigeration*, 2, 28–31. (In Russian)
36. Smirnova, I. A., Gutov, N. Yu., Lukin, A. A. (2018). Research of composition of milk protein concentrates. *Food Processing: Techniques and Technology*, 48(1), 85–90. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-1-85-90> (In Russian)
37. Melnikova, E. I., Ponomarev, A. N., Popova, E. E. (2012). Milk proteins in ice cream technology. *Dairy Industry*, 12, 64–65. (In Russian)
38. Landikhovskaya, A. V. (2021). Research on composition and quality indices of low-calorie ice cream without sucrose. *Food Systems*, 4(3S), 179–183. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-3S-179-183> (In Russian)
39. Landikhovskaya, A. V., Tvorogova, A. A., Kazakova, N. V. (2021). The use of glucose-fructose syrups in ice cream without sucrose with the low contents of fat. *Food Industry*, 5, 71–74. <https://doi.org/10.52653/PPI.2021.5.5.017> (In Russian)
40. Tvorogova, A. A., Gurskiy, I. A., Shobanova, T. V. (2022). Biological indicators of protein quality of enriched cream ice cream. *Dairy Industry*, 3, 39–41. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2022-03-39-41> (In Russian)
41. Tanerova L. N. Method of production and composition of protein ice-cream. Patent RF 2661396. 2017 (In Russian)
42. Danesh, E., Goudarzi, M., Jooyandeh, H. (2017). Short communication: Effect of whey protein addition and transglutaminase treatment on the physical and sensory properties of reduced-fat ice cream. *Journal of Dairy Science*, 100(7), 5206–5211. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12537>
43. Gurskiy, I. A., Tvorogova, A. A. (2022). The effect of whey protein concentrates on technological and sensory quality indicators of ice cream. *Food Processing: Techniques and Technology*, 52(3), 439–448. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-3-2376> (In Russian)
44. El-Zeini, H. M., Moneir, El-Abd M., Mostafa, A. Z., Yasser, El-Gh. F. H. (2016). Effect of incorporating whey protein concentrate on chemical, rheological and textural properties of ice cream. *Journal of Food Processing and Technology*, 07(2), Article 1000546. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000546>
45. Tvorogova, A. A., Kazakova, N. V. (June 21–23, 2022). Peculiarities of using products of whey processing in ice-cream production. Proceedings of the International scientific-practical conference “Topical questions of production of cheese, butter and other dairy products”. Uglich, Russia, 2022. (In Russian)
46. Shokhalova, V. N., Kusin, A. A., Shokhalov, V. A., Kostyukov, E. M. (2017). Investigation of ice-cream air phase with a curd whey NF concentrate. *Molochnokhozyaistvenny Vestnik*, 2(26), 130–137. (In Russian)
47. Demina, E. N., Berezina, N. A., Kazakov, A. V. (2021). Optimization of the formulation of ice cream by the method of simplex-lattice planning *Storage and Processing of Farm Products*, 1, 104–116. <https://doi.org/10.36107/spfp.2021.192> (In Russian)
48. Poursani, P., Razavi, S. M. A., Tehrani, M. M., Javidi, F. (2020). Rheological, physical and sensory properties of non-fat ice creams as affected by selected fat replacers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), Article e15010. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15010>
49. Alvarez, V. B., Wolters, C. L., Vodovotz, Y., Ji, T. (2005). physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 862–871. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72752-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72752-1)
50. Baranov, S. (2014). New generation of the plants for microparticulation. *Dairy Industry*, 6, 22–23. (In Russian)
51. E, X., Pei, Z. J., Schmidt, K. A. (2010). Ice cream: Foam formation and stabilization — a review. *Food Reviews International*, 26(2), 122–137. <https://doi.org/10.1080/87559120903564472>
52. Khodyreva, Z. R., Shchetinin, M. P., Vajtanis, M. A., Shchetinina E. M., Loginova, A. A. (October 20–24, 2020). Justification for the development of an enriched frozen dessert with the addition of whey protein. Proceedings of the 7th International scientific-practical conference “Modern achievements of biotechnology. Technique, technology and packaging for realization of innovative projects in enterprises of food and biotechnological industry”. Pyatigorsk: Publishing House PF NCFU II, 2020. (In Russian)
53. Awad, R. A., Metwally, A. I. (2000). Evaluation of total milk proteinate as a milk solids source in ice cream manufacture. *Annals of Agricultural Science (Cairo)*, 45(2), 603–618.
54. Akalin, A.S., Karagözlü, C., Ünal, G. (2008). Rheological properties of reduced-fat and low-fat ice cream containing whey protein isolate and inulin. *European Food Research and Technology*, 227, 889–895. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0800-z>
55. Puangmanee, S., Hayakawa, S., Sun, Y., Ogawa, M. (2008). Application of whey protein isolate glycated with rare sugars to ice cream. *Food Science and Technology Research*, 14(5), 457–466. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.457>
56. Seo, C. W., Oh N. S. (2022). Functional application of Maillard conjugate derived from a κ-carrageenan/milk protein isolate mixture as a stabilizer in ice cream. *LWT*, 161, Article 113406. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113406>
57. Daw, E., Hartel, R. W. (2015). Fat destabilization and melt-down of ice creams with increased protein content. *International Dairy Journal*, 43, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.001>
58. Roy, S., Hussain, S. A., Prasad, W. G., Khetra, Y. (2022). Quality attributes of high protein ice cream prepared by incorporation of whey protein isolate. *Applied Food Research*, 2(1), Article 100029. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2021.100029>
59. Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S. et al. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3235–3241. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>
60. Gómez-Masclaque, L. G., Miralles, B., Recio, I., López-Rubio, A. (2016). Microencapsulation of a whey protein hydrolysate within micro-hydrogels: Impact on gastrointestinal stability and potential for functional yoghurt development. *Journal of Functional Foods*, 26, 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.006>
61. Sakkas, L., Tzevdou, M., Zoidou, E., Gkotzia, E., Karvounis, A., Samara, A. et al. (2019). Yoghurt-type gels from skim sheep milk base enriched with whey protein concentrate hydrolysates and processed by heating or high hydrostatic pressure. *Foods*, 8(8), Article 342. <https://doi.org/10.3390/foods8080342>
62. Agarkova, E. Yu., Kruchinin, A. G., Glazunova, O. A., Fedorova, T. V. (2019). Whey protein hydrolysate and pumpkin pectin as nutraceutical and prebiotic components in a functional mousse with antihypertensive and bifidogenic properties. *Nutrients*, 11(12), Article 2930. <https://doi.org/10.3390/nu11122930>
63. Asaithambi, N., Singha, P., Singh, S. K. (2022). Recent application of protein hydrolysates in food texture modification. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2081665>
64. Nepovinnikh N. V., Semina A. I., Novokshanova A. L., Ptichkina N. M. Functional purpose dessert production method. Patent RF 708 331, 2018. (In Russian).
65. Ewert, J., Schlierenkamp, F., Fischer, L., Stressler, T. (2019). Application of a technofunctional caseinate hydrolysate to replace surfactants in ice cream. *Chemie Ingenieur Technik*, 91(7), 1024–1031. <https://doi.org/10.1002/cite.201800153>
66. Ewert, J., Gluck, C., Zeeb, B., Weiss, J., Stressler, T., Fischer, L. (2018). Modification of the interfacial properties of sodium caseinate using a commercial peptidase preparation from *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Hydrocolloids*, 81, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.036>
67. Vajda, Á., Zeke, I., Juhász, R., Barta, J., Balla, Cs. (2013). Effect of acid whey concentrate on thermophysical properties of milk-based ice-cream. *Acta Alimentaria*, 42 (Suppl), 107–115. <https://doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.Supp.13>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Ситникова Полина Борисовна — кандидат технических наук, научный сотрудник, Лаборатория технологии мороженого, Всероссийский научно-исследовательский институт холодильной промышленности 127422, Москва, ул. Костякова, 12 Тел.: +7-495-610-83-85 E-mail: sitnikova.p.b@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4098-9146 * автор для контактов	Polina B. Sitnikova, Candidate of Technical Sciences, Researcher, Laboratory of Ice Cream Technology, All-Russian Scientific Research Institute of Refrigeration Industry 12, Kostyakova Str., 127422, Moscow, Russia Tel.: +7-495-610-83-85 E-mail: sitnikova.p.b@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4098-9146 * corresponding author
Казаква Наталия Владимировна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Лаборатория технологии мороженого, Всероссийский научно-исследовательский институт холодильной промышленности 127422, Москва, ул. Костякова, 12 Тел.: +7-495-610-83-85 E-mail: nkazak.53@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2963-6294	Natalia V. Kazakova, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Ice Cream Technology, All-Russian Scientific Research Institute of Refrigeration Industry 12, Kostyakova Str., 127422, Moscow, Russia Tel.: +7-495-610-83-85 E-mail: nkazak.53@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2963-6294
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-539-546>

Поступила 28.08.2023

Поступила после рецензирования 13.12.2023

Принята в печать 18.12.2023

© Полищук Е. К., Арюзина М. А., Спирина М. Е., Котенкова Е. А., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ВЛИЯНИЕ pH НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ SUS SCROFA

Полищук Е. К., Арюзина М. А., Спирина М. Е., Котенкова Е. А.*

Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

электрофорез,
ImageJ, pI, агрегация,
ферменты,
протеолиз,
биологически
активные вещества

Поджелудочная железа (ПЖ) свиней содержит множество ферментов, структурных, регуляторных, секреторных, рецепторных и других биологически активных веществ, обеспечивающих как функционирование органа, так и его биологическую роль в организме. Целью настоящей работы было изучение влияния изменения pH в 0,9%-м растворе хлорида натрия, используемого в качестве экстрагента, на эффективность извлечения биологически активных веществ белковой природы из поджелудочной железы свиней. Экстракцию проводили 0,9% NaCl, 0,9% NaCl pH=4 и 0,9% NaCl, pH=8,5 со скоростью перемешивания 400 об/мин в течение 150 мин при 4 °C, соотношение ПЖ: экстрагент 1:5, супернатант отделяли центрифугированием. Концентрация белка была измерена биуретовой реакцией на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Biochem SA. Протеомный состав экстрактов и нативной поджелудочной железы оценивали методом одномерного электрофореза по Лэммли в 10% полиакриламидном геле в камере VE-10. Полные цифровые изображения электрофореграмм получали с помощью сканера Bio-5000 Plus, затем их редактировали в графическом редакторе и анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ. При определении интенсивности белковых фракций отмечалось, что применение 0,9% NaCl способствовало большему выходу в экстрагент белков с молекулярными массами (Мм) 200 кДа, 150 кДа, 69 кДа, 52 кДа и 33 кДа, смещение pH в кислую область стимулировало выход фракций с молекулярными массами 130 кДа, 50 кДа, 49 кДа, 45 кДа, 40 кДа, 30 кДа и 27 кДа, а в щелочную — только 47 кДа и 42 кДа. Большинство протеолитических ферментов ПЖ имеет молекулярную массу в диапазоне 34–23 кДа, за исключением незрелой формы карбоксипептидаз с Мм 45–47 кДа, на полученных электрофореграммах наибольшая интенсивность белковых полос выражена в области с Мм менее 33 кДа. Также отмечалось присутствие интенсивных белковых фракций в области молекулярных масс менее 50–52 кДа и 40 кДа, что может соответствовать таким ферментам, как панкреатическая липаза и фосфолипаза А2, и наличие белковых фракций с Мм выше 130 кДа, соответствующих различным типам и изоформам коллагена и ламинина. Кроме того, такие процессы, как белковая агрегация и протеолиз также могут оказывать влияние на молекулярно-массовое распределение белковых фракций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование выполнено в рамках темы НИР FNEN-2019–0008 государственного задания ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН.

Received 28.08.2023

Accepted in revised 13.12.2023

Accepted for publication 18.12.2023

© Polishchuk E. K., Aryuzina M. A., Spirina M. E., Kotenkova E. A., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

INFLUENCE OF pH ON PROTEIN EXTRACTION FROM SUS SCROFA PANCREAS

Ekaterina K. Polishchuk, Marina A. Aryuzina, Maria E. Spirina, Elena A. Kotenkova*

V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

KEY WORDS:

electrophoresis,
ImageJ, pI,
aggregation, enzymes,
proteolysis, biologically
active substances

ABSTRACT

The porcine pancreas contains various enzymes, structural, regulatory, secretory, receptor and other biologically active substances that ensure both the functioning of the organ and its biological role in the organism. The aim of this work was to study the influence of pH changes in 0.9% sodium chloride solution used as an extractant on the efficiency of bioactive protein isolation from the porcine pancreas. The extraction was carried out with the 0.9% NaCl, 0.9% NaCl pH=4 and 0.9% NaCl pH= 8.5 with a stirring speed of 400 rpm for 150 min at 4 °C; the ratio of pancreas: extractant was 1:5; the supernatant was separated by centrifugation. The protein concentration was measured by a biuret reaction on a semi-automatic biochemical analyzer Biochem SA. The proteomic composition of extracts and native pancreas was evaluated by 10% SDS-PAGE according to Laemmli method in the "VE10" chamber. Digital images of electrophoregrams were obtained using a Bio-5000 Plus scanner, edited in a graphic editor and analyzed using ImageJ software. When determining the intensity of protein fractions, it was noted that the use of 0.9% NaCl contributed to a greater yield of proteins with molecular weights of 200 kDa, 150 kDa, 69 kDa, 52 kDa and 33 kDa into the extractant; a pH shift to the acidic area stimulated the yield of fractions with molecular weights of 130 kDa, 50 kDa, 49 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 30 kDa and 27 kDa, and a pH shift to the alkaline area — only 47 kDa and 42 kDa. Most pancreas proteolytic enzymes have a molecular weight in a range of 34–23 kDa, excepting the immature form of carboxypeptidases with MW 45–47 kDa. The greatest intensity of protein bands was observed in the region with MW less than 33 kDa on the obtained electrophoregrams. The presence of intense protein fractions in the region of molecular weights of less than 50–52 kDa and 40 kDa was also noted, which may correspond to enzymes such as pancreatic lipase and phospholipase A2, and the presence of protein fractions with MW above 130 kDa corresponding to various types and isoforms of collagen and laminin. In addition, such processes as protein aggregation and proteolysis can also influence the molecular weight distribution of protein fractions.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FNEN-2019–0008 of the state assignment of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Полищук, Е. К., Арюзина, М. А., Спирина, М. Е., Котенкова, Е. А. (2023). Влияние pH на извлечение белков из поджелудочной железы Sus scrofa. *Пищевые системы*, 6(4), 539–546. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-539-546>

FOR CITATION: Polishchuk, E. K., Aryuzina, M. A., Spirina, M. E., Kotenkova, E. A. (2023). Influence of pH on protein extraction from Sus scrofa pancreas. *Food Systems*, 6(4), 539–546. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-539-546>

1. Введение

Поджелудочная железа (ПЖ) — сложный орган, состоящий из дифференцированных клеток и внеклеточного матрикса, организованных надлежащим образом для обеспечения ее эндокринных и экзокринных функций [1]. Эндокринный отдел организован в структуры, известные как островки Лангерганса. Они состоят из пяти типов клеток, продуцирующих такие гормоны, как инсулин, глюкагон, грелин, соматостатин и др. [2]. Экзокринная ПЖ является источником ферментов, необходимых для процесса пищеварения [3], включая протеолитические (трипсин и химотрипсин, которые секретируются в виде проферментов: трипсиногена, химотрипсиногена, карбоксипептидазы и эластазы), липолитические (липаза, фосфолипаза и эстераза), гликолитические (лактаза и амилаза) и нуклеолитические (рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза) энзимы [4,5]. Кроме того, ПЖ содержит множество структурных, регуляторных, секреторных, рецепторных и др. белков, обеспечивающих как функционирование органа, так и его биологическую роль в организме.

Поджелудочные железы (ПЖ) свиней ранее активно использовались в больших количествах с целью получения инсулина для пациентов с сахарным диабетом [6], однако сокращение объема переработки скота после 1990-х годов [7], а также внедрение технологий рекомбинантного ДНК [8] привели к резкому снижению объемов переработки этого животного сырья. В настоящий момент протеомный профиль ПЖ свиней продолжает изучаться [9], а некоторые пищевые ферменты по-прежнему получают из ПЖ свиней [10,11,12]. Интересно, что компоненты ПЖ, в частности децеллюляризованный внеклеточный матрикс поджелудочной железы, полученный из поджелудочной железы крысы, могут способствовать развитию ткани поджелудочной железы человека. В связи с этим протеом децеллюляризованной поджелудочной железы свиней разного возраста и пола был также изучен с целью идентификации биоактивных молекул, играющих ключевую роль в создании тканеспецифичных сигналов для инженерии тканей *in vitro* [13].

В Российской Федерации коэффициент переработки поджелудочной железы свиней, несмотря на высокое содержание в ней ценных биоактивных веществ, довольно низкий, и важными остаются вопросы разработки простых технологических решений для извлечения белковых веществ из тканевого матрикса, что соответствует принципам циркулярной экономики. Экстракция на водной основе остается самым бюджетным методом, при котором наиболее важным является знание значения изoeлектрической точки (pI) целевых белков [14]. При смещении pH в щелочную или кислую область белки приобретают отрицательный или положительный заряд. Это приводит к электростатическому отталкиванию между молекулами и гидратации заряженных остатков, что способствует повышению растворимости белков [14,15]. Более того, соли также могут стабилизировать белковые молекулы [14,16]. К примеру, космотропные соли, такие как NaCl, действуют как стабилизатор белка и образуют полярную структуру воды [14,17].

Целью настоящей работы было изучение влияния изменения pH в 0,9%-м растворе хлорида натрия, используемого в качестве экстрагента, на эффективность извлечения биологически активных веществ белковой природы из поджелудочной железы свиней.

2. Объекты и методы

Поджелудочная железа свиней была отобрана на ООО «Пушкинский мясной двор», Московская область, г. Пушкино. Животное сырье очищали от соединительных тканей, замораживали при минус 18 °С, затем в замороженном виде измельчали и замораживали до дальнейшего проведения экстракции. Измельченную поджелудочную железу (ПЖ) размораживали при температуре 4 °С и смешивали с экстрагентом в соотношении 1:5. Экстракцию проводили в лабораторной диспергирующей установке (ЛДУ, «Лаботекс», Россия) со скоростью перемешивания 400 об/мин; время экстрагирования составляло 150 мин при 4 °С.

Было проведено 3 экстракции со следующими экстрагентами:

- 1) 0,9%-й раствор натрия хлорида (ООО «Гематек», Россия), (0,9% NaCl);
- 2) 0,9%-й раствор NaCl (ООО «Гематек», Россия) с добавлением 1М уксусной кислоты (х. ч., «Компонент-Реактив», Россия) до достижения в растворе значения pH 4,0;
- 3) 0,9%-й раствор натрия хлорида (ООО «Гематек», Россия) с добавлением 1М гидроксида натрия (PanReac AppliChem, США) до достижения в растворе значения pH 8,5.

Значения pH экстрагентов регистрировали с использованием pH-метра ST3100-F (OHAUS, США).

По завершении процесса экстракции супернатант отделяли центрифугированием в течение 5 минут со скоростью 3 500 об/мин (ELMI CM-6M, Латвия). В каждом образце была измерена концентрация белка путем проведения биуретовой реакции на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Biochem SA (HTI, США) с использованием коммерческого реактива «Общий белок» (HTI, США). Измерения выполнялись в трех повторностях.

Протеомный состав экстрактов и нативной поджелудочной железы оценивали методом одномерного электрофореза по Лэммли. Пробоподготовку образцов осуществляли следующим образом: 100 мкл / 100 мг образца смешивали с 1000 мкл лизирующего раствора (9 М мочевины (PanReac, Германия), 5% β-меркаптоэтанол (PanReac, Germany), 2% тритон X-100 (Helicon, Россия), 2% амфолины pH 3–10 (Serva, Германия)). Полученный гомогенат осветляли центрифугированием при 14 000 об/мин в течение 20 минут. Затем супернатант отделяли и добавляли к нему в соотношении 1:1 белковый буфер. Для приготовления белкового буфера в пробирки типа «эппендорф» вносили следующие компоненты: 1 мл 10%-го додецилсульфата натрия (SDS, PanReac, Испания), 250 мкл концентрированного β-меркаптоэтанол (PanReac, Germany), 625 мкл 0,5 М Трис-HCl (PanReac, Germany), 1,5 г мочевины (PanReac, Germany), бромфеноловый синий (Helicon, Россия) для придания буферу темной окраски, после чего доливали воду до объема 5 мл. Смесь супернатанта с белковым буфером прогревали на кипящей водяной бане в течение 5 минут. Для проведения одномерного электрофореза использовали камеру VE-10 (Helicon, Россия) и заполняли ее 10%-м полиакриламидным гелем. Поверх него заливали 6%-й гель, сделав в нем лунки для внесения образцов. Исследуемые образцы вносили в количестве 15 мкл. В качестве буфера использовали раствор, содержащий 25 мМ трис-HCl (PanReac, Germany), 192 мМ глицина (PanReac, Germany) и 0,1% SDS (PanReac, Germany). Электрофорез осуществляли при следующих параметрах: первые 30 минут — 60 В и далее при 120 В, пока фронт красителя (бромфеноловый синий (Helicon, Россия)) не достигнет нижнего края гелевых пластин. В качестве раствора стандартов применяли маркер, состоящий из препаратов — стандартов молекулярных масс (Thermo Scientific, США). Окрашивание белков проводили в растворе следующего состава: 10% уксусной кислоты (Fisher scientific, United Kingdom), 25% изопропанола (PanReac, Germany), 0,05% кумасси G-250 (Helicon, Россия). Для удаления не связавшегося красителя использовали 10%-ю уксусную кислоту (Fisher scientific, United Kingdom). Окрашивание азотнокислым серебром (PanReac, Germany) осуществляли согласно методике [18]. Электрофореграммы были выполнены в трех повторностях. Для проведения компьютерной денситометрии применяли электрофореграммы, находившиеся во влажном состоянии. Их полные цифровые изображения получали с помощью сканера Bio-5000 Plus (Serva, Германия) в режиме 600 ppi 2D-RGB. Полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе и анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США). Результаты рассчитывались с использованием программы STATISTICA 10.0 и представлялись в виде «среднее значение ± стандартное отклонение». Статистическую достоверность определяли однопараметрическим ANOVA тестом с применением критерия Шеффе. Вероятность 0,05 была выбрана в качестве значимого уровня.

3. Результаты и обсуждение

Результаты определения концентрации белка в экстрактах, полученных с использованием 0,9% натрия хлорида, а также с применением 0,9% натрия хлорида с разными начальными значениями pH, представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Результаты определения концентрации белка в экстрактах

Table 1. Results of determination of the protein concentration in the extracts

Экстрагент	0.9% NaCl	0.9% NaCl, pH = 4	0.9% NaCl, pH = 8,5
Концентрация белка в экстракте, г/л	24,41 ± 1,08	21,59 ± 1,66	22,69 ± 1,78

Статистически значимых изменений концентраций белка в экстрактах с различными начальными значениями pH обнаружено не было, однако при использовании в качестве экстрагента 0,9%-го раствора хлорида натрия отмечалась наибольшая концентрация белка в экстракте, которая превышала содержание белка в экстракте со смещенным в кислую область значения pH на 15,1%. Молекулярно-массовое распределение белкового состава полученных экстрактов оценивали посредством денситометрии одномерных электрофореграмм, представленных на Рисунке 1.

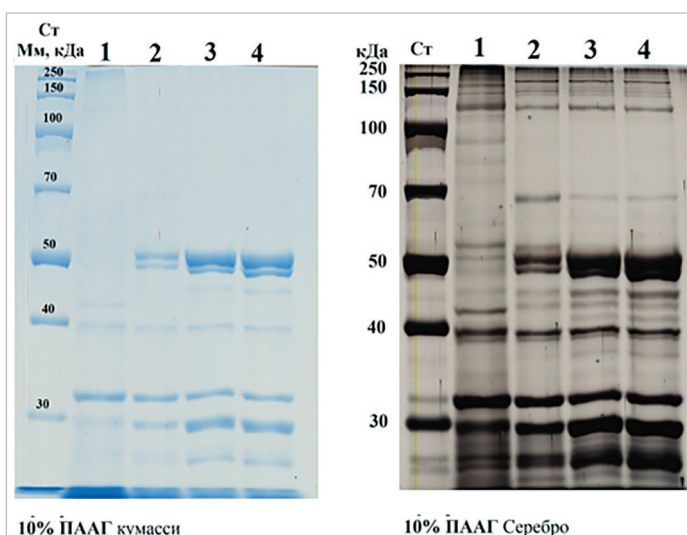


Рисунок 1. Одномерные электрофореграммы экстрактов и ткани поджелудочной железы

Figure 1. One-dimensional electrophoregrams of extracts and tissue of pancreas

Ст — стандарт молекулярных масс; 1 — нативная поджелудочная железа (ПЖ); 2 — экстракт ПЖ с 0,9%-м раствором NaCl; 3 — экстракт ПЖ с 0,9%-м раствором NaCl (pH = 4); 4 — экстракт ПЖ с 0,9%-м раствором NaCl (pH = 8,5)

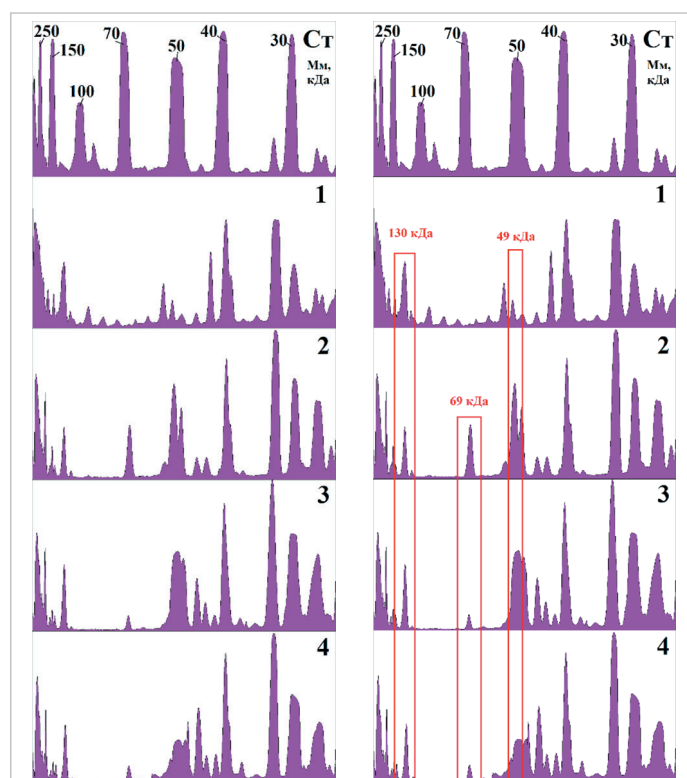


Рисунок 2. График интенсивности белковых фракций

Figure 2. Graph of the intensity of protein fractions

Ст — стандарт молекулярных масс; 1 — нативная поджелудочная железа (ПЖ); 2 — экстракт ПЖ с 0,9%-м раствором NaCl; 3 — экстракт ПЖ с 0,9%-м раствором NaCl (pH = 4); 4 — экстракт ПЖ с 0,9%-м раствором NaCl (pH = 8,5)

Для дальнейшего анализа выбрано изображение электрофореграммы, окрашенной азотнокислым серебром. Обработка полученного изображения электрофореграмм с помощью программного комплекса ImageJ представлена в виде графика (Рисунок 2), где каждой белковой полосе на электрофореграмме соответствовал определенный пик. Площади каждого пика были измерены и выражены в условных единицах. Результаты приведены в Таблице 2.

Во всех экстрактах присутствовали высокомолекулярные фракции с молекулярной массой (Мм) 200 кДа, 160 кДа и 140 кДа. Они отсутствовали в нативной ПЖ, в которой проявлялась фракция с Мм 170 кДа (площадь пика 683 ± 25 у. е.). Наибольшее присутствие фракции с Мм 200 кДа отмечалось в экстракте 0,9% NaCl и составило $2180,8 \pm 50,3$ у. е., статистически достоверно превышая вариант со смещением значения pH в щелочную область на 14,4% ($p \leq 0,05$). Значения площадей пиков для белковых фракций с Мм 160 кДа и 140 кДа незначительно отличались между образцами. Фракция с Мм 150 кДа наблюдалась во всех образцах, однако интенсивнее всего она проявлялась в экстракте с 0,9%-м раствором NaCl ($699,3 \pm 29,3$ у. е.). Это значение превышало величину ее интенсивности в ПЖ и в экстрак-

тах с pH=4 и pH=8,5 в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), 1,9 раза ($p \leq 0,05$) и 1,8 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. Наименьшая интенсивность фракции 150 кДа отмечалась в экстрактах со смещением pH в кислую и щелочную области ($366,7 \pm 7,5$ и $397,3 \pm 66,8$ у. е.) и была ниже ее интенсивности в ПЖ на 29,7% ($p \leq 0,05$) и 23,8% ($p \leq 0,05$) соответственно.

Белковая фракция в области молекулярных масс 130 кДа присутствовала во всех образцах и наиболее интенсивно проявлялась в нативной ПЖ ($4310,0 \pm 63,1$ у. е.), превышая ее интенсивность во всех экстрактах в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), 1,3 раза ($p \leq 0,05$) и 1,6 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. Наибольший выход этой белковой фракции наблюдался при использовании варианта со смещением значения pH в кислую область. Интенсивность фракции 130 кДа составила

Таблица 2. Площади пиков, соответствующих мажорным белковым фракциям

Table 2. Peak areas corresponding to major protein fractions

Площадь пиков, у. е.							
Мм, кДа	200	170	160	150	140	130	95
ПЖ	н/о	$683,2 \pm 25,4$	н/о	$521,3 \pm 16,6^a$	н/о	$4310,0 \pm 63,1^a$	$1146,2 \pm 28,4$
0,9% NaCl	$2180,8 \pm 50,3^a$	н/о	$295,0 \pm 49,1$	$699,3 \pm 29,3^{b,c}$	$259,4 \pm 58,6$	$2433,1 \pm 105,8^{b,c}$	н/о
0,9% NaCl, pH = 4	$2027,6 \pm 75,0$	н/о	$264,1 \pm 19,5$	$366,7 \pm 7,5^{b,d}$	$257,0 \pm 23,3$	$3204,7 \pm 97,3^{b,d}$	н/о
0,9% NaCl, pH = 8,5	$1906,3 \pm 129,4^b$	н/о	$305,2 \pm 32,4$	$397,3 \pm 66,8^{b,d}$	$369,5 \pm 47,5$	$2660,7 \pm 157,5^{b,c}$	н/о
Площадь пиков, у. е.							
Мм, кДа	85	72	69	52	50	49	47
ПЖ	$568,5 \pm 44,2$	$500,9 \pm 15,6$	н/о	$2644,3 \pm 50,4^a$	$1452,6 \pm 34,4^a$	$890,5 \pm 32,3^a$	$682,6 \pm 7,7^a$
0,9% NaCl	н/о	н/о	$3782,9 \pm 23,3^a$	$967,7 \pm 76,9^b$	$8724,9 \pm 142,6^{b,c}$	$4248,8 \pm 56,2^{b,c}$	$1190,5 \pm 16,1^{b,c}$
0,9% NaCl, pH = 4	н/о	н/о	$732,9 \pm 17,5^b$	н/о	$11582,6 \pm 404,8^{b,d,e}$	$4813,8 \pm 234,4^{b,d}$	$3492,1 \pm 17,4^{b,d,e}$
0,9% NaCl, pH = 8,5	н/о	н/о	$804,2 \pm 54,5^b$	н/о	$6035,1 \pm 1075,9^{b,d,f}$	$4202,3 \pm 95,4^{b,c}$	$5695,6 \pm 146,8^{b,d,f}$
Площадь пиков, у. е.							
Мм, кДа	45	44	42	40	33	30	27
ПЖ	н/о	$4332,5 \pm 129,6$	н/о	$11641,1 \pm 222,2^a$	$14781,7 \pm 394,8^a$	$7976,0 \pm 411,4^a$	$4711,1 \pm 202,2^a$
0,9% NaCl	$1213,4 \pm 10,4^a$	н/о	н/о	$10397,6 \pm 84,5^{b,c}$	$16720,4 \pm 309,2^{b,c}$	$12119,8 \pm 224,3^{b,c}$	$11206,1 \pm 188,6^{b,c}$
0,9% NaCl, pH = 4	$1581,9 \pm 49,6^{b,c}$	н/о	$794,8 \pm 57,7^a$	$10967,9 \pm 124,5^{b,d}$	$15935,2 \pm 177,5^{b,d}$	$16266,4 \pm 111,9^{b,d,e}$	$12203,1 \pm 239,4^{b,d,e}$
0,9% NaCl, pH = 8,5	$1405,5 \pm 30,9^{b,d}$	н/о	$1619,8 \pm 57,3^b$	$10736,8 \pm 177,9^b$	$16520,2 \pm 140,5^b$	$14230,6 \pm 62,8^{b,d,f}$	$9986,1 \pm 146,4^{b,d,f}$

Примечание: н/о — не обнаружено, * a-b, c-d, e-f — разные буквы обозначают статистически достоверные различия ($p \leq 0,05$).

3204,7±97,3 у. е. и превышала величины вариантов с применением 0,9% NaCl и со смещением pH в щелочную область на 31,7% ($p \leq 0,05$) и 20,4% ($p \leq 0,05$) соответственно. Белковые фракции с Мм 95 кДа, 85 кДа и 72 кДа проявлялись только в нативной поджелудочной железе и отсутствовали в экстрактах, в то время как белковая фракция с Мм 69 кДа обнаруживалась только в экстрактах. С наибольшей интенсивностью — в экстракте 0,9% NaCl (3782,9±23,3 у. е.), что превышало ее интенсивность экстрактах с pH ≤ 4 и pH ≤ 8,5 в 5,2 раза ($p \leq 0,05$) и 4,7 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. В нативной ПЖ четко проявлялась фракция с Мм 52 кДа с интенсивностью 2644,3±50,4 у. е., которая присутствовала только в экстракте с 0,9% NaCl и отсутствовала в двух других экстрактах. Ее выход в экстракт был в 2,7 раза ниже ($p \leq 0,05$), чем детектировалось в ПЖ.

Наиболее ярко были выражены белковые полосы в области Мм менее 50 кДа. Так, в нативной ПЖ присутствовали белковые фракции с Мм 50, 49 и 47 кДа, однако их выраженность в экстрактах была существенно выше. Наибольшая интенсивность фракции с Мм 50 кДа наблюдалась в экстракте со смещением pH в кислую область и составляла 11582,6±404,8 у. е. Это значение превышало величину интенсивности данной фракции в ПЖ, в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением pH в щелочную область в 8,0 раз ($p \leq 0,05$), в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) и в 1,9 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. Интенсивность фракции 50 кДа в экстракте с pH ≤ 8,5 составила 6035,1±1075,9 у. е. и была ниже ее интенсивности в других экстрактах на 30,8% ($p \leq 0,05$) и 47,9% ($p \leq 0,05$) соответственно. Интенсивность фракции с Мм 49 кДа была выше в экстрактах в среднем в 4,7–5,4 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с тканью ПЖ. Наибольшая интенсивность фракции с Мм 49 кДа наблюдалась в экстракте со смещением pH в кислую область (4813,8±234,4 у. е.), превышая величину ее интенсивности в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением pH в щелочную область на 13,3% ($p \leq 0,05$) и 14,6% ($p \leq 0,05$) соответственно. Отмечается возрастающее проявление фракции (Мм 47 кДа) в ряду ПЖ < 0,9% NaCl < 0,9% NaCl, pH ≤ 4 < 0,9% NaCl, pH ≤ 8,5 (682,6±7,7 < 1190,5±16,1 < 3492,1±17,4 < 5695,66±146,8). Так, наибольшая интенсивность фракции с Мм 47 кДа наблюдалась в экстракте со смещением pH в щелочную область, превышая величину ее интенсивности в ПЖ, в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением pH в кислую область в 8,3 раза ($p \leq 0,05$), 4,8 раза ($p \leq 0,05$) и 1,6 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. При этом интенсивность фракции 47 кДа в экстракте с 0,9% NaCl была ниже ее интенсивности в других экстрактах на 65,9% ($p \leq 0,05$) и 78,7% ($p \leq 0,05$) соответственно. Белковая фракция 44 кДа была представлена только в нативном сырье, однако в экстрактах проявлялись полосы белков с Мм 45 и 42 кДа. Наибольшая интенсивность фракции с Мм 45 кДа наблюдалась в экстракте со смещением pH в кислую область (1581,9±49,6 у. е.), превышая величину ее интенсивности в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением pH в щелочную область на 30,4%

($p \leq 0,05$) и 12,6% ($p \leq 0,05$) соответственно. Белковая фракция с Мм 42 кДа детектировалась только в экстрактах с модифицированной величиной pH, причем в экстракте со смещением pH в щелочную область ее интенсивность составила 1619,8±57,3 у. е., превышая величину варианта с pH ≤ 4,5 в 2,0 раза ($p \leq 0,05$).

Полосы на электрофореграммах в области Мм 40–27 кДа обнаруживались во всех образцах. Белковая фракция в области молекулярных масс 40 кДа наиболее интенсивно проявлялась в нативной ПЖ (11641,1±222,2 у. е.), превышая ее интенсивность во всех экстрактах 12,0% ($p \leq 0,05$), 6,1% ($p \leq 0,05$) и 8,4% ($p \leq 0,05$) соответственно. В отношении белковой фракции с Мм 33 кДа, напротив, наблюдалось увеличение ее интенсивности в экстрактах. Наибольшей она была при использовании 0,9% NaCl и со смещением pH в щелочную область (16720,4±309,2 у. е. и 16520,2±140,5 у. е. соответственно), и превышала ее интенсивность в нативной ПЖ на 13,1% ($p \leq 0,05$) и 11,8% ($p \leq 0,05$) соответственно. В целом, резких отличий в изменении интенсивности фракций 40 и 33 кДа не отмечалось. Белковые полосы в области Мм 30 кДа в экстрактах проявлялись интенсивнее по сравнению с нативным сырьем. Наибольшая интенсивность наблюдалась в экстракте со смещением pH в кислую область (16266,4±111,9 у. е.), превышая величину ее интенсивности в ПЖ, в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением pH в щелочную область в 2,0 раза ($p \leq 0,05$), на 34,0% ($p \leq 0,05$) и 14,3% ($p \leq 0,05$) соответственно. Интенсивность фракции 30 кДа в экстракте с использованием 0,9% NaCl составила 12119,8±224,3 у. е. и была ниже ее интенсивности в экстрактах со смещением pH в кислую и щелочную области на 25,5% ($p \leq 0,05$) и 14,4% ($p \leq 0,05$) соответственно. Интересно заметить, что в нативном сырье присутствовали фракции 27 и 26 кДа с площадями пиков 2763±74 и 1948±157 у. е. соответственно (в Таблице 2 представлена сумма 4711,1±202,2 у. е.), а в трех экстрактах они были представлены одной мажорной фракцией с площадью 11206,1±188,6, 12203,1±39,4 и 9986,1±146,4 у. е. Ее интенсивность была выше в экстрактах в среднем в 2,1–2,6 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с тканью ПЖ. Наименьшая интенсивность наблюдалась в экстракте со смещением pH в щелочную область и была ниже ее величины в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением pH в кислую область на 10,9% ($p \leq 0,05$) и 18,2% ($p \leq 0,05$) соответственно.

В целом, наиболее заметные отличия на треках электрофореграммы наблюдались в области 50 кДа и ниже. Различная интенсивность белковых фракций, их отсутствие в экстрактах свидетельствует не только о низкой экстрактивности определенных белков, но и об их энзиматической модификации, протеолизе или об агрегации в процессах экстракции. ПЖ содержит множество ферментов, структурных, регуляторных, секреторных, рецепторных и др. белков. В Таблице 3 приведены характеристики основных протеолитических ферментов, присутствующих в ПЖ.

Таблица 3. Характеристики основных протеолитических ферментов, присутствующих в ПЖ свиней

Table 3. Characteristics of the main proteolytic enzymes present in porcine pancreas

Фермент	Мм, кДа	pI	pH _{опт}	Ссылки
Трипсиноген	25,9	6,85		
Трипсин	24,4/23,5*	7,0/8,26*	7,0–9,0	[10,19–22]
Пептидаза S1	23,3	8,26		
	27,5–29,2			
Химотрипсиноген	27,5–29,1/25,6*	6,68–7,43/6,86*		
B2	25,7			
A	27,3±0,5			
Химотрипсин	24,1	8,3	7,0–8,0	[11,23–28]
A	24,1	4,7		
Пептидаза S1	23,9	6,1		
C	28,9/27,3*	4,96/4,96*		
Пептидаза S1	25,9	4,86		
Карбоксипептидаза			8,0–10,0	
A1	47,2/45,6/34,7*	5,13/5,13/5,46*	7,5	[12,29–33]
B	47,4/45,8/34,7*	5,24/5,24/5,73	7,6–7,7	
	21,9–28,821		8,0–10,0	
Эластаза	28,8/27,1/25,9*	8,42/8,11/8,44*		
Химотрипсиноподобная эластаза 1	25,7	8,44	8,7	
Пептидаза S1			8,1–8,8	[12,34–37]
Химотрипсиноподобная эластаза 2A	28,7/27,1/25,8*	8,33/8,08/7,68*	8,5–9,0	
Пептидаза S1	25,6	7,68	8,0	

Примечание: * для зрелого белка в случаях, когда есть белок-предшественник с сигнальным пептидом, пропептидом или пептидом активации.

Согласно систематизированным данным, приведенным в Таблице 3, большинство протеолитических ферментов ПЖ имеют молекулярную массу в диапазоне 34–23 кДа, за исключением незрелой формы карбоксипептидазы с Мм 45–47 кДа. На полученных электрограммах наибольшая интенсивность белковых полос выражена в области с Мм менее 33 кДа. Как правило, теоретические Мм и рI немного отличаются от расчетных вариантов [38,39]. Это происходит в связи с наличием посттрансляционных модификаций (фосфорилирование, гликозилирование и т. д.), с отщеплением сигнальных или иных последовательностей, с образованием белковых комплексов, различных белковых изоформ, а также ввиду неспецифического протеолитического расщепления и деградации белка [40].

Вариант рН со смещением в щелочную сторону находился вблизи изотэлектрических точек эластаз и зрелой формы трипсина, которые расположены в области 27 кДа, площадь пика с $\text{pH} \leq 8,5$ была ниже ее величины в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением рН в кислую область на 10,9% ($p \leq 0,05$) и 18,2% ($p \leq 0,05$) соответственно. Незрелые формы карбоксипептидаз в области 45–47 кДа характеризовались кислой рI, наибольшая интенсивность фракции с Мм 47 кДа наблюдалась в экстракте со смещением рН в щелочную область, превышая величину ее интенсивности в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением рН в кислую область в 4,8 раза ($p \leq 0,05$) и в 1,6 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. В области 40 кДа существенных различий по интенсивности белковых фракций не наблюдалось, в этом в диапазоне молекулярных масс могут находиться такие белки, как свиная панкреатическая фосфолипаза А2 [41], аннексин А1 [42], а в области 50–52 кДа — свиная панкреатическая липаза [43], α -амилаза [44], рецептор гастрина [45]. Панкреатическая триацилглицероллипаза и белок-2, связанный с липазой поджелудочной железы, имеют рI 5,73–6,10 [46,47], а наибольшая интенсивность фракции с Мм 50 кДа наблюдалась в экстракте со смещением рН в кислую область. Это превышало величину ее интенсивности в экстрактах с 0,9% NaCl и со смещением рН в щелочную область в 8,0 раз ($p \leq 0,05$), в 1,3 раза ($p \leq 0,05$) и в 1,9 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. Кроме того, в ПЖ свиней идентифицируются различные типы ламинина в области Мм 200 кДа [48,49], коллаген и его изоформы [50–53] с диапазоном молекулярных масс 116–315 кДа [54–62], что соответствует молекулярно-массовому распределению, полученному в нашей работе.

ПЖ содержит также множество структурных, регуляторных, секреторных, рецепторных и др. белков, а в одной фракции на одном-двух электрофорезах, как правило, содержится множество белков со сходной молекулярной массой, но с различной изотэлектрической точкой [63,64]. Кроме того, изменение молекулярно-массового распределения белков может быть следствием протеолитической

активности энзимов, которые в большом количестве присутствуют в ткани ПЖ. Для карбоксипептидаз оптимум действия лежит в области рН 7,5–7,7 [31,32], а для трипсина и химотрипсина — в области 7,0–9,0 [10,11,21,22,26,27], в то время как для смеси пищевых ферментов ПЖ оптимумом считается рН 8–10 [12]. В нашей работе рассмотрены разные варианты рН при экстракции, но значительной изменчивости белковых полос, связанных с высокой активацией энзимов, отмечено не было. Это связано с тем, что ферменты трипсин и химотрипсин секретируются в виде проферментов: трипсиногена, химотрипсиногена [4,5], а сама экстракция проходила при 4 °С, что было существенно ниже оптимальной температуры действия присутствующих энзимов [12]. С другой стороны, животные ткани подвергают процессам автолиза [65], которые также происходят в тканях ПЖ post mortem и при экстракции [66–69], что может отражаться на молекулярно-массовом распределении белкового профиля при проведении электрофоретического анализа.

4. Выводы

Поджелудочная железа свиней содержит множество биологически активных веществ, включая гормоны и пищеварительные ферменты. При изучении влияния рН на молекулярно-массовое распределение белковых фракций в полученных экстрактах было показано, что наибольшая интенсивность белковых фракций отмечалась в области молекулярных масс менее 50 кДа. Это соответствует таким энзимам, как панкреатическая липаза (50–52 кДа), незрелые формы карбоксипептидаз (45–47 кДа), фосфолипаза А2 (40 кДа), эластазы и зрелые формы трипсина (27 кДа). В целом, большинство протеолитических ферментов имеет молекулярную массу в диапазоне 34–23 кДа, что соответствовало наибольшей интенсивности белковых полос на полученных треках. Также наблюдалось присутствие белковых фракций, соответствующих согласно величине молекулярных масс различным типам и изоформам коллагена и ламинина. При анализе интенсивности белковых фракций отмечалось, что применение 0,9% NaCl способствовало большему выходу в экстрагент белков с молекулярными массами 200 кДа (2180,8 ± 50,3 у. е.), 150 кДа (699,3 ± 29,3 у. е.), 69 кДа (3782,9 ± 23,3 у. е.), 52 кДа (967,7 ± 76,9 у. е.) и 33 кДа (16720,4 ± 309,2 у. е.). Смещение рН в кислую область стимулировало выход фракций с молекулярными массами 130 кДа (3204,7 ± 97,3 у. е.), 50 кДа (11582,6 ± 404,8 у. е.), 49 кДа (4813,8 ± 234,4 у. е.), 45 кДа (1581,9 ± 49,6 у. е.), 40 кДа (10967,9 ± 124,5 у. е.), 30 кДа (16266,4 ± 111,9 у. е.) и 27 кДа (12203,1 ± 239,4 у. е.), а в щелочную — только 47 кДа (5695,6 ± 146,8 у. е.) и 42 кДа (1619,8 ± 57,3 у. е.). Кроме того, такие процессы, как белковая агрегация и протеолиз также могут оказывать влияние на молекулярно-массовое распределение белковых фракций.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. A-Kader, H. H., Ghishan, F. K. (2012). The Pancreas. Chapter in a book: Textbook of Clinical Pediatrics: Springer Berlin Heidelberg. 2012. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02202-9_198
2. Mastracci, T. L., Sussel, L. (2012). The endocrine pancreas: Insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), 609–628. <https://doi.org/10.1002/wdev.44>
3. Pandiri, A. R. (2014). Overview of exocrine pancreatic pathobiology. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 207–216. <https://doi.org/10.1177/0192623513509907>
4. Karpińska, M., Czuderna, M. (2022). Pancreas — Its functions, disorders, and physiological impact on the mammals' organism. *Frontiers in Physiology*, 13, Article 807632. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>
5. Chen, X. (2021). Protein Composition and Biogenesis of the Pancreatic Zymogen Granules. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. Retrieved from <https://www.pancreapedia.org/reviews/protein-composition-and-biogenesis-of-pancreatic-zymogen-granules>. Accessed August 20, 2023.
6. Ladisch, M. R., Kohlmann, K. L. (1992). Recombinant human insulin. *Biotechnology Progress*, 8(6), 469–478. <https://doi.org/10.1021/bp00018a001>
7. Василевская, Е. Р., Арюзина, М. А., Ветрова, Е. С. (2021). Водно-солевая экстракция как метод получения смеси биологически активных соединений белковой природы из поджелудочной железы свиньи. *Пищевые системы*, 4(2), 97–105. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-4-2-97-105>
8. Siew, Y. Y., Zhang, W. (2021). Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from *E. coli* inclusion bodies. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), Article 65. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00419-w>
9. Ahn, J. Y., Kim, I. Y., Oh, S. J., Hwang, H. S., Yi, S. S., Kim, Y. N. et al. (2014). Proteomic analysis of domestic pig pancreas during development using two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Laboratory Animal Research*, 30(2), 45–53. <https://doi.org/10.5625/lar.2014.30.2.45>
10. Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M. et al. (2021). Safety evaluation of food enzyme trypsin from porcine pancreas. *EFSA Journal*, 19(6), Article e06637. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6637>
11. Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M. et al. (2021). Safety evaluation of a food enzyme containing trypsin and chymotrypsin from porcine pancreas. *EFSA Journal*, 19(1), Article e06369. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6369>
12. Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M. et al. (2021). Safety evaluation of a food enzyme containing trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase from porcine pancreas. *EFSA Journal*, 19(1), Article e06368. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6368>
13. Hu, M., Bi, H., Moffat, D., Blystone, M., DeCostanza, L., Alayi, T. et al. (2021). Proteomic and bioinformatic analysis of decellularized pancreatic extracellular matrices. *Molecules*, 26(21), Article 6740. <https://doi.org/10.3390/molecules26216740>
14. Kotenkova, E. A., Polishchuk, E. K. (2022). Technological approaches to the extraction and purification by ultrafiltration techniques of target protein molecules from animal tissues: a review. *Theory and Practice of Meat Processing*, 7(2), 76–82. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-2-76-82>
15. Yasothai, R., Giriprasad, R. (2015). Acid/Alkaline solubilization method of processing protein. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 4(1), 96–100.
16. Hani, F. M., Cole, A. E., Altman, E. (2019). The ability of salts to stabilize proteins in vivo or intracellularly correlates with the Hofmeister series of ions. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 10(3), 23–31.
17. Lebendiker, M., Danieli, T. (2014). Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Letters*, 588(2), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.044>
18. Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93–99. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>
19. P00761 · TRYPSIN (Trypsin). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00761/entry/function>. Accessed August 21, 2023.
20. A0A4X1V2S2 · A0A4X1V2S2 PIG (Trypsinogen). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A4X1V2S2/entry>. Accessed August 21, 2023.
21. Zamani, A., Rezaei, M., Madani, R. (2013). A comparative study on some kinetic and biochemical properties of trypsin enzyme from Common Kilk (Clupeonella cultriventris caspia) and Porcine. *Journal of Fisheries*, 66(2), 145–158.

22. Deng, Y., Gruppen, H., Wierenga, P. A. (2018). Comparison of protein hydrolysis catalyzed by bovine, porcine, and human trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(16), 4219–4232. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00679>
23. G1ARD6 · G1ARD6_PIG (Chymotrypsin C). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/G1ARD6/entry>. Accessed August 21, 2023.
24. A0A480M2A7 · A0A480M2A7_PIG (Chymotrypsinogen B2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A480M2A7/entry>. Accessed August 21, 2023.
25. A0A480INX1 · A0A480INX1_PIG (Chymotrypsinogen B2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A480INX1/entry>. Accessed August 21, 2023.
26. Johnson, K. D., Marshall, S., Clark, A. (2005). A functional comparison of ovine and porcine chymotrypsins. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48(3), 311–319. <https://doi.org/10.1080/00288233.2005.9513661>
27. Hudáky, P., Kaslik, G., Venekei, I., Gráf, L. (1999). The differential specificity of chymotrypsin A and B is determined by amino acid 226. *European Journal of Biochemistry*, 259(1–2), 528–533. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00075.x>
28. Горшков, А. В., Придатченко, М. Л., Перлова, Т. Ю., Тарасова, И. А., Горшков, М. В., Евреинов, В. В. (2016). О применимости концепции критической хроматографии к задачам протеомики. I. Влияние природы неподвижной фазы и размеров хроматографической колонки на зависимость времени удерживания пептидов и белков от последовательности аминокислотных остатков в цепи. *Журнал аналитической химии*, 71(1), 113–128. <https://doi.org/10.7868/S0044450216010059>
29. P09954 · CBPA1_PIG (Carboxypeptidase A1). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09954/entry>. Accessed August 21, 2023.
30. P09955 · CBPB1_PIG (Carboxypeptidase B). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09955/entry>. Accessed August 21, 2023.
31. Koide, A., Yoshizawa, M., Kurachi, K. (1981). Crystallization and Properties of Carboxypeptidase A₁ from Porcine Pancreas. *European Journal of Biochemistry*, 117(2), 383–388. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06349.x>
32. Südi, P., Dala, E., Szajáni, B. (1989). Preparation, characterization, and application of a novel immobilized carboxypeptidase B. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 22(1), 31–43. <https://doi.org/10.1007/BF02922695>
33. Carboxypeptidase B from porcine pancreas. MERCK. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/c9584>. Accessed August 21, 2023.
34. P00772 · CELA1_PIG (Chymotrypsin-like elastase family member 1). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00772/entry>. Accessed August 21, 2023.
35. Ardel, W. (1974). Partial purification and properties of porcine pancreatic elastase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Enzymology*, 341(2), 318–326. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(74\)90224-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(74)90224-1)
36. Sundberg, L., Kristiansen, T. (1972). Chemical fixation of elastase to agarose. *FEBS Letters*, 22(2), 175–177. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(72\)80037-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(72)80037-1)
37. Elastase, Porcine Pancreas, High Purity, Crystallized. MERCK. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/mm/324682>. Accessed August 21, 2023.
38. Полищук, Е. К., Котенкова, Е. А., Ковалев, Л. И. (2023). Методологические подходы к извлечению веществ с антимикробной направленностью действия из сырья животного происхождения. *Все о мясе*, 3, 70–76. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2023-5-70-76>
39. Kotenkova, E., Lukinova, E., Kovalyov, L. (2018). Bovine mucous membranes as a source of antimicrobial compounds. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12(1), 667–672. <https://doi.org/10.5219/976>
40. Szczesna, K. (2019). Why Does the Molecular Weight of My Protein Differ from the Theoretically Expected Weight? Technology Networks — Proteomics & Metabolomics. Retrieved from <https://www.technologynetworks.com/proteomics/articles/why-does-the-molecular-weight-of-my-protein-differ-from-the-theoretically-expected-weight-322079>. Accessed August 21, 2023.
41. van den Berg, B., Tessari, M., Boelens, R., Dijkman, R., Kaptein, R., de Haas, G.H. et al. (1995). Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ complexed with micelles and a competitive inhibitor. *Journal of Biomolecular NMR*, 5(2), 110–121. <https://doi.org/10.1007/BF00208802>
42. P19619 · ANXA1_PIG (Annexin A1). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P19619/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
43. Gonçalves, G. R. F., Gandolfi, O. R. R., Brito, M. J. P., Bonomo, R. C. F., da Costa Ilhéu Fontan, R., Veloso, C. M. (2021). Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. *Process Biochemistry*, 111(2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.10.027>
44. Sun, L., Qin, T., Liu, Y., Zhao, H., Xia, X., Lei, X. (2018). Cloning, expression, and characterization of a porcine pancreatic α-amylase in *Pichia pastoris*. *Animal Nutrition*, 4(2), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.11.004>
45. Morisset, J., Wong, H., Walsh, J.H., Lainé, J., Bourassa, J. (2000). Pancreatic CCK_B receptors: Their potential roles in somatostatin release and δ-cell proliferation. *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(1), G148–G156. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.1.G148>
46. D7EZN2 · LIPR2_PIG (Pancreatic lipase-related protein 2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/D7EZN2/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
47. P00591 · LIPP_PIG (Pancreatic triacylglycerol lipase). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00591/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
48. A0A287AWV5 · A0A287AWV5_PIG (Laminin subunit beta-2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A287AWV5/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
49. F1RZM4 · F1RZM4_PIG (Laminin subunit alpha 4). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1RZM4/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
50. Vigier, S., Gagnon, H., Bourgade, K., Klarskov, K., Fülöp, T., Vermette, P. (2017). Composition and organization of the pancreatic extracellular matrix by combined methods of immunohistochemistry, proteomics and scanning electron microscopy. *Current Research in Translational Medicine*, 65(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.10.001>
51. Hilling, D., Rijkkelijkhuizen, J. K. R. A., Töns, H. A. M., Terpstra, O. T., Bouwman, E. (2009). Amount and distribution of collagen in the pancreas have no effect on porcine islet isolation outcome. *Transplantation Proceedings*, 41(1), 326–327. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.065>
52. Sackett, S. D., Tremmel, D. M., Ma, F., Feeney, A. K., Maguire, R. M., Brown, M. E. et al. (2018). Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Scientific Reports*, 8(1), Article 10452. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28857-1>
53. Meyer, T., Czub, S., Chodnewska, I., Beutner, U., Hamelmann, W., Klöck, G. et al. (1997). Expression pattern of extracellular matrix proteins in the pancreas of various domestic pig breeds, the Goettingen Minipig and the Wild Boar. *Annals of Transplantation*, 2(3), 17–26.
54. A0A287A1S6 · A0A287A1S6_PIG (Collagen alpha-1(I) chain preproprotein). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A287A1S6/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
55. A0A8D0ILD8 · A0A8D0ILD8_PIG (Collagen type III alpha 1 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0ILD8/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
56. F1SNP0 · F1SNP0_PIG (Collagen type IV alpha 3 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1SNP0/entry>. Accessed August 21, 2023.
57. A0A8D0IML7 · A0A8D0IML7_PIG (Collagen type IV alpha 5 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0IML7/entry>. Accessed August 21, 2023.
58. A0A286ZXV9 · A0A286ZXV9_PIG (Collagen type IV alpha 4 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A286ZXV9/entry>. Accessed August 21, 2023.
59. F1S021 · F1S021_PIG (Collagen type V alpha 1 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1S021/entry>. Accessed August 21, 2023.
60. A0A8D0XNT6 · A0A8D0XNT6_PIG (Collagen type V alpha 2 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0XNT6/entry>. Accessed August 21, 2023.
61. F1S3G7 · F1S3G7_PIG (Collagen type V alpha 3 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1S3G7/entry>. Accessed August 21, 2023.
62. A0A8D0XY85 · A0A8D0XY85_PIG (Collagen type VI alpha 3 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0XY85/entry>. Accessed August 21, 2023.
63. Fedulova, L., Vasilevskaya, E., Tikhonova, O., Kazieva, L., Tolmacheva, G., Makarenko, A. (2022). Proteomic markers in the muscles and brain of pigs recovered from hemorrhagic stroke. *Genes*, 13(12), Article 2204. <https://doi.org/10.3390/genes13122204>
64. Zgoda, V. G., Moskhovskii, S.A., Ponomarenko, E. A., Andreewski, T. V., Kopylov, A. T., Tikhonova, O. V. et al. (2009). Proteomics of mouse liver microsomes: Performance of different protein separation workflows for LC–MS/MS. *Proteomics*, 9(16), 4102–4105. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900050>
65. Чернуха И. М., Федуллова Л. В., Котенкова Е. А., Шишкин С. С., Ковалев Л. И. (2016). Влияние автолиза на протеомно-пептидный профиль сердечной мышцы и аорты *Bos taurus* и *Sus scrofa*. *Теория и практика переработки мяса*, 1(2), 4–9. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2016-1-2-4-9>
66. Shimizu, M., Hayashi, T., Saitoh, Y., Ohta, K., Itoh, H. (1990). Postmortem Autolysis in the Pancreas: Multivariate statistical study. The influence of clinicopathological conditions. *Pancreas*, 5(1), 91–94. <https://doi.org/10.1097/00006676-199001000-00013>
67. Siriwardana, R. C., Deen, K. I., Hevawesenthi, J. (2010). Postmortem sampling of the pancreas for histological examination: What is the optimum cut-off time? *JOP: Journal of the Pancreas*, 11(1), 87–88.
68. Granlund, L., Hedin, A., Wahlhütter, M., Seiron, P., Korsgren, O., Skog, O. et al. (2021). Histological and transcriptional characterization of the pancreatic acinar tissue in type 1 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 9(1), Article e002076. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-002076>
69. Gill, J. R. (2016). Pancreatitis: A forensic perspective. *Academic Forensic Pathology*, 6(2), 237–248. <https://doi.org/10.23907/2016.025>

REFERENCES

1. A-Kader, H. H., Ghishan, F. K. (2012). The Pancreas. Chapter in a book: Textbook of Clinical Pediatrics: Springer Berlin Heidelberg. 2012. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02202-9_198
2. Mastracci, T. L., Sussel, L. (2012). The endocrine pancreas: Insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), 609–628. <https://doi.org/10.1002/wdev.44>
3. Pandiri, A. R. (2014). Overview of exocrine pancreatic pathobiology. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 207–216. <https://doi.org/10.1177/0192623313509907>
4. Karpińska, M., Czauderna, M. (2022). Pancreas — Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Frontiers in Physiology*, 13, Article 807632. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>
5. Chen, X. (2021). Protein Composition and Biogenesis of the Pancreatic Zymogen Granules. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. Retrieved from <https://www.pancreapedia.org/reviews/protein-composition-and-biogenesis-of-pancreatic-zymogen-granules>. Accessed August 20, 2023.
6. Ladisch, M. R., Kohlmann, K. L. (1992). Recombinant human insulin. *Biotechnology Progress*, 8(6), 469–478. <https://doi.org/10.1021/bp00018a001>
7. Vasilevskaya E. R., Aryuzina M. A., Vetrova E. S. (2021). Saline extraction as a method of obtaining a mixture of biologically active compounds of protein nature from porcine pancreas. *Food Systems*, 4(2), 97–105. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-4-2-97-105> (In Russian)

8. Siew, Y. Y., Zhang, W. (2021). Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from *E. coli* inclusion bodies. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), Article 65. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00419-w>
9. Ahn, J. Y., Kim, I. Y., Oh, S. J., Hwang, H. S., Yi, S. S., Kim, Y. N. et al. (2014). Proteomic analysis of domestic pig pancreas during development using two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Laboratory Animal Research*, 30(2), 45–53. <https://doi.org/10.5625/lar.2014.30.2.45>
10. Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M. et al. (2021). Safety evaluation of food enzyme trypsin from porcine pancreas. *EFSA Journal*, 19(6), Article e06637. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6637>
11. Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M. et al. (2021). Safety evaluation of a food enzyme containing trypsin and chymotrypsin from porcine pancreas. *EFSA Journal*, 19(1), Article e06369. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6369>
12. Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M. et al. (2021). Safety evaluation of a food enzyme containing trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase from porcine pancreas. *EFSA Journal*, 19(1), Article e06368. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6368>
13. Hu, M., Bi, H., Moffat, D., Blystone, M., DeCostanza, L., Alayi, T. et al. (2021). Proteomic and bioinformatic analysis of decellularized pancreatic extracellular matrices. *Molecules*, 26(21), Article 6740. <https://doi.org/10.3390/molecules26216740>
14. Kotenkova, E. A., Polishchuk, E. K. (2022). Technological approaches to the extraction and purification by ultrafiltration techniques of target protein molecules from animal tissues: a review. *Theory and Practice of Meat Processing*, 7(2), 76–82. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2022-7-2-76-82>
15. Yasothai, R., Giriprasad, R. (2015). Acid/Alkaline Solubilization method of processing protein. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 4(1), 96–100.
16. Hani, F. M., Cole, A. E., Altman, E. (2019). The ability of salts to stabilize proteins *in vivo* or intracellularly correlates with the Hofmeister series of ions. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 10(3), 23–31.
17. Lebendiker, M., Danieli, T. (2014). Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Letters*, 588(2), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.044>
18. Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93–99. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>
19. P00761 · TRYPSIN_PIG (Trypsin). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00761/entry#function>. Accessed August 21, 2023.
20. A0A4X1V2S2 · A0A4X1V2S2_PIG (Trypsinogen). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A4X1V2S2/entry>. Accessed August 21, 2023.
21. Zamani, A., Rezai, M., Madani, R. (2013). A comparative study on some kinetic and biochemical properties of trypsin enzyme from Common Kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) and Porcine. *Journal of Fisheries*, 66(2), 145–158.
22. Deng, Y., Gruppen, H., Wierenga, P. A. (2018). Comparison of protein hydrolysis catalyzed by bovine, porcine, and human trypsins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(16), 4219–4232. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00679>
23. G1ARD6 · G1ARD6_PIG (Chymotrypsin C). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/G1ARD6/entry>. Accessed August 21, 2023.
24. A0A480M2A7 · A0A480M2A7_PIG (Chymotrypsinogen B2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A480M2A7/entry>. Accessed August 21, 2023.
25. A0A480INX1 · A0A480INX1_PIG (Chymotrypsinogen B2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A480INX1/entry>. Accessed August 21, 2023.
26. Johnson, K. D., Marshall, S., Clark, A. (2005). A functional comparison of ovine and porcine chymotrypsins. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48(3), 311–319. <https://doi.org/10.1080/00288233.2005.9513661>
27. Huddák, P., Kaslik, G., Venekei, I., Gráf, L. (1999). The differential specificity of chymotrypsin A and B is determined by amino acid 226. *European Journal of Biochemistry*, 259(1–2), 528–533. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00075.x>
28. Gorshkov, A. V., Evreinov, V. V., Pridatchenko, M. L., Perlova, T. Y., Tarasova, I. A., Gorshkov, M. V. (2016). Applicability of the critical chromatography concept to proteomics problems: I. Effect of the stationary phase and the size of the chromatographic column on the dependence of the retention time of peptides and proteins on the amino acid sequence. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(1), 110–125. <https://doi.org/10.7868/S0044450216010059> (In Russian)
29. P09954 · CBPA1_PIG (Carboxypeptidase A1). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09954/entry>. Accessed August 21, 2023.
30. P09955 · CBPB1_PIG (Carboxypeptidase B). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P09955/entry>. Accessed August 21, 2023.
31. Koide, A., Yoshizawa, M., Kurachi, K. (1981). Crystallization and properties of Carboxypeptidase A from porcine pancreas. *European Journal of Biochemistry*, 117(2), 383–388. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06349.x>
32. Südi, P., Dala, E., Szajáni, B. (1989). Preparation, characterization, and application of a novel immobilized carboxypeptidase B. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 22(1), 31–43. <https://doi.org/10.1007/BF02922695>
33. Carboxypeptidase B from porcine pancreas. MERCK. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/sigma/c9584>. Accessed August 21, 2023.
34. P00772 · CELA1_PIG (Chymotrypsin-like elastase family member 1). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00772/entry>. Accessed August 21, 2023.
35. Ardelit, W. (1974). Partial purification and properties of porcine pancreatic elastase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Enzymology*, 341(2), 318–326. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(74\)90224-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(74)90224-1)
36. Sundberg, L., Kristiansen, T. (1972). Chemical fixation of elastase to agarose. *FEBS Letters*, 22(2), 175–177. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(72\)80037-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(72)80037-1)
37. Elastase, Porcine Pancreas, High Purity, Crystallized. MERCK. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/mm/324682>. Accessed August 21, 2023.
38. Polishchuk, E. K., Kotenkova, E. A., Kovalev, L. I. (2013). Methodological approaches to the extraction of substances with antimicrobial action from animal raw materials. *Vsyo o Myase*, 3, 70–76. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2023-3-70-76> (In Russian)
39. Kotenkova, E., Lukinova, E., Kovalyov, L. (2018). Bovine mucous membranes as a source of antimicrobial compounds. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 12(1), 667–672. <https://doi.org/10.5219/976>
40. Szczesna, K. (2019). Why Does the Molecular Weight of My Protein Differ from the Theoretically Expected Weight? Technology Networks — Proteomics and Metabolomics. Retrieved from <https://www.technologynetworks.com/proteomics/articles/why-does-the-molecular-weight-of-my-protein-differ-from-the-theoretically-expected-weight-322079>. Accessed August 21, 2023.
41. van den Berg, B., Tessari, M., Boelens, R., Dijkman, R., Kaptein, R., de Haas, G. H. et al. (1995). Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ complexed with micelles and a competitive inhibitor. *Journal of Biomolecular NMR*, 5(2), 110–121. <https://doi.org/10.1007/BF00208802>
42. P19619 · ANXA1_PIG (Annexin A1). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P19619/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
43. Gonçalves, G. R. F., Gandolfi, O. R. R., Brito, M. J. P., Bonomo, R. C. F., da Costa Ilhéu Fontan, R., Veloso, C. M. (2021). Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. *Process Biochemistry*, 111(2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.10.027>
44. Sun, L., Qin, T., Liu, Y., Zhao, H., Xia, X., Lei, X. (2018). Cloning, expression, and characterization of a porcine pancreatic α -amylase in *Pichia pastoris*. *Animal Nutrition*, 4(2), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.11.004>
45. Morisset, J., Wong, H., Walsh, J. H., Lainé, J., Bourassa, J. (2000). Pancreatic CCK₈ receptors: Their potential roles in somatostatin release and δ -cell proliferation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(1), G148–G156. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.1.G148>
46. D7EZN2 · LIPR2_PIG (Pancreatic lipase-related protein 2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/D7EZN2/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
47. P00591 · LIPP_PIG (Pancreatic triacylglycerol lipase). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00591/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
48. A0A287AWV5 · A0A287AWV5_PIG (Laminin subunit beta-2). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A287AWV5/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
49. F1RZM4 · F1RZM4_PIG (Laminin subunit alpha 4). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1RZM4/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
50. Vigier, S., Gagnon, H., Bourgade, K., Klarskov, K., Füllöp, T., Vermette, P. (2017). Composition and organization of the pancreatic extracellular matrix by combined methods of immunohistochemistry, proteomics and scanning electron microscopy. *Current Research in Translational Medicine*, 65(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.10.001>
51. Hilling, D., Rijkkelikhuijzen, J. K. R. A., Töns, H. A. M., Terpstra, O. T., Bouwman, E. (2009). Amount and Distribution of Collagen in the Pancreas Have No Effect on Porcine Islet Isolation Outcome. *Transplantation Proceedings*, 41(1), 326–327. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.065>
52. Sackett, S. D., Tremmel, D. M., Ma, F., Feeney, A. K., Maguire, R. M., Brown, M. E. et al. (2018). Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Scientific Reports*, 8(1), Article 10452. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28857-1>
53. Meyer, T., Czub, S., Chodniewska, I., Beutner, U., Hamelmann, W., Klöck, G. et al. (1997). Expression pattern of extracellular matrix proteins in the pancreas of various domestic pig breeds, the Goettingen Minipig and the Wild Boar. *Annals of Transplantation*, 2(3), 17–26.
54. A0A287A1S6 · A0A287A1S6_PIG (Collagen alpha-1(I) chain preproprotein). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A287A1S6/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
55. A0A8D0ILD8 · A0A8D0ILD8_PIG (Collagen type III alpha 1 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0ILD8/entry#sequences>. Accessed August 21, 2023.
56. F1SNP0 · F1SNP0_PIG (Collagen type IV alpha 3 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1SNP0/entry>. Accessed August 21, 2023.
57. A0A8D0IML7 · A0A8D0IML7_PIG (Collagen type IV alpha 5 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0IML7/entry>. Accessed August 21, 2023.
58. A0A286ZXV9 · A0A286ZXV9_PIG (Collagen type IV alpha 4 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A286ZXV9/entry>. Accessed August 21, 2023.
59. F1S021 · F1S021_PIG (Collagen type V alpha 1 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1S021/entry>. Accessed August 21, 2023.
60. A0A8D0XNT6 · A0A8D0XNT6_PIG (Collagen type V alpha 2 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0XNT6/entry>. Accessed August 21, 2023.
61. F1S3G7 · F1S3G7_PIG (Collagen type V alpha 3 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/F1S3G7/entry>. Accessed August 21, 2023.
62. A0A8D0XY85 · A0A8D0XY85_PIG (Collagen type VI alpha 3 chain). UniProt. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8D0XY85/entry>. Accessed August 21, 2023.
63. Fedulova, L., Vasilevskaya, E., Tikhonova, O., Kazieva, L., Tolmacheva, G., Makarenko, A. (2022). Proteomic markers in the muscles and brain of pigs recovered from hemorrhagic stroke. *Genes*, 13(12), Article 2204. <https://doi.org/10.3390/genes13122204>
64. Zgoda, V. G., Moshkovskii, S. A., Ponomarenko, E. A., Andreewski, T. V., Kopylov, A. T., Tikhonova, O. V. et al. (2009). Proteomics of mouse liver microsomes: Performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS. *Proteomics*, 9(16), 4102–4105. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900050>

65. Chernukha, I. M., Fedulova, L. V., Kotenkova, E. A., Shishkin, S. S., Kovalyov, L. I. (2016). The influence of autolysis on the protein-peptide profile of *Bos taurus* and *Sus scrofa* heart and aorta tissues. *Theory and Practice of Meat Processing*, 1(2), 4–9. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2016-1-2-4-9> (In Russian)
66. Shimizu, M., Hayashi, T., Saitoh, Y., Ohta, K., Itoh, H. (1990). Postmortem Autolysis in the Pancreas: Multivariate statistical study. The influence of clinicopathological conditions. *Pancreas*, 5(1), 91–94. <https://doi.org/10.1097/00006676-199001000-00013>
67. Siriwardana, R. C., Deen, K. I., Hevawesenthi, J. (2010). Postmortem sampling of the pancreas for histological examination: What is the optimum cut-off time? *JOP: Journal of the Pancreas*, 11(1), 87–88.
68. Granlund, L., Hedin, A., Wahlhütter, M., Seiron, P., Korsgren, O., Skog, O. et al. (2021). Histological and transcriptional characterization of the pancreatic acinar tissue in type 1 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 9(1), Article e002076. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-002076>
69. Gill, J. R. (2016). Pancreatitis: A Forensic Perspective. *Academic Forensic Pathology*, 6(2), 237–248. <https://doi.org/10.23907/2016.025>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Полищук Екатерина Константиновна — младший научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 129) E-mail: e.politchuk@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2719-9649	Ekaterina K. Polishchuk, Junior Researcher, Experimental Clinic — Research Laboratory of Biologically Active Substances of an Animal Origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (129) E-mail: e.politchuk@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2719-9649
Арюзина Марина Александровна — старший лаборант, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 128) E-mail: m.aryuzina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6886-496X	Marina A. Aryuzina, Senior Laboratory Assistant, Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (128) E-mail: m.aryuzina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6886-496X
Спирина Мария Евгеньевна — старший лаборант, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-95-11 (доб. 207) E-mail: m.spirina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4544-4433	Maria E. Spirina, Senior Laboratory Assistant, Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (207) E-mail: m.spirina@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4544-4433
Котенкова Елена Александровна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Экспериментальная клиника-лаборатория биологически активных веществ животного происхождения, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова 109316, Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-495-676-92-11 (доб. 129) E-mail: lazovlena92@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1864-8115 * автор для контактов	Elena A. Kotenkova, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Experimental Clinic — Research Laboratory of Biologically Active Substances of an Animal Origin, V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems 26, Talalikhina str., 109316, Moscow, Russia Tel.: +7-495-676-95-11 (129) E-mail: lazovlena92@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1864-8115 * corresponding author
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-547-553>



Received 11.09.2023

Accepted in revised 30.11.2023

Accepted for publication 06.12.2023

© Smykov I. T., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

THE KINETICS OF MILK GEL STRUCTURE FORMATION STUDIES BY ELECTRON MICROSCOPY

Igor T. Smykov

All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking, Uglich, Yaroslavl Region, Russia

KEY WORDS:

milk, casein micelle, gelation mechanism, electron microscopy, microstructure, cheese production

ABSTRACT

The aim of this study is to enhance the comprehension of the mechanism of enzymatic gelation in milk by visualizing the evolution of its microstructure through transmission electron microscopy. In order to minimize the potential for artifacts during the preparation process and eliminate any possible difficulties in interpreting the resulting images, three distinct methods were employed in the research: shading the surface topography with vacuum deposition of heavy metal, negative staining of the specimen with a heavy metal solution and replicating a cleavage of a quick-frozen sample. The selection of time intervals for sampling the gel during its evolution is determined by the most probable significant modifications in the resulting gel. Based on the research, it has been shown that natural milk is a nonequilibrium system from the perspective of statistical thermodynamics. A notable observation is that the glycomacropeptides forming the hair layer on the surface of casein micelles are unevenly distributed, leading to the formation of micelle dimers and trimers. It has been determined that during the initial stage of enzymatic gelation in milk, clusters of loosely bound micelles are formed in areas with the highest concentration. The formation of micelle chains is absent at this stage due to the non-anisometric nature of micelles and the energetic disadvantage of their formation. It has been found that under the influence of enzymatic gelation near the gel point, a hierarchical process involving the transformation of the milk's protein component is activated. The trigger mechanism for this process is a cooperative conformational transition in clusters of casein micelles, which initiates a chain of more energy-intensive reactions in the following sequence: *hydro-phobic interactions* → *hydrogen bridges* → *electrostatic interactions* → *calcium bridges*. The result is the conversion of loosely bound micelle clusters into denser aggregates, predominantly contributing to the formation of milk curd. It is worth noting that gelation in milk can be regarded as a process that reduces the free energy of the dispersed system. Understanding the correlation between the decrease in the free energy value during gelation and the physical properties of the finished cheese and other dairy products continues to be a relevant area of research.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FNEN-2019-0010 of the state assignment of the V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS.

Поступила 11.09.2023

Поступила после рецензирования 30.11.2023

Принята в печать 06.12.2023

© Смыков И. Т., 2023

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КИНЕТИКИ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ МОЛОЧНОГО ГЕЛЯ

Смыков И. Т.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, Углич, Ярославская область, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

молоко, мицелла казеина, механизм гелеобразования, электронная микроскопия, микроструктура, производство сыра

Цель этой работы заключается в улучшении понимания механизма ферментативного гелеобразования в молоке за счёт визуализация эволюции его микроструктуры с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Для снижения возможности возникновения артефактов препарирования и устранения проблем достоверной интерпретации получаемых изображений в работе были использованы три различных способа подготовки препаратов к исследованиям: оттенивание топографии поверхности вакуумным напылением тяжелого металла; негативное окрашивание препарата раствором тяжелого металла; репликация скола быстрозамороженного образца. Выбор моментов времени отбора образцов геля в процессе его эволюции обусловлен наиболее вероятными существенными изменениями в образующемся геле. В результате исследований показано, что с точки зрения статистической термодинамики натуральное молоко является неравновесной системой. Отмечено, что волосковый слой казеиномакропептидов на поверхности мицелл казеина распределён неравномерно, что способствует образованию димеров и тримеров мицелл. Определено, что в первичной фазе ферментативного гелеобразования в молоке образуются слабосвязанные кластеры мицелл в местах их наибольшей концентрации. Образование цепочек мицелл на этом этапе не наблюдается, что объясняется отсутствием анизотрии мицелл и энергетической невыгодностью их образования. Установлено, что при ферментативном гелеобразовании в молоке вблизи гель-точки запускается иерархический процесс преобразований белковой составляющей молока. Спусковым механизмом этого процесса является кооперативный конформационный фазовый переход в кластерах мицелл казеина, который вызывает цепочку более энергоёмких реакций в последовательности: *гидрофобные взаимодействия* → *водородные связи* → *электростатические взаимодействия* → *кальциевые мостики*. Результатом чего является преобразование слабосвязанных кластеров мицелл в более плотные агрегаты, преимущественно из которых окончательно формируется молочный сгусток. Отмечено, что в целом гелеобразование в молоке можно рассматривать как процесс, снижающий величину свободной энергии, а определение того, как уровень снижения величины свободной энергии молока при гелеобразовании связано с физическими свойствами готового сыра и других молочных продуктов остаётся актуальной темой исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FNEN-2019-0010 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

FOR CITATION: Smykov, I. T. (2023). The kinetics of milk gel structure formation studies by electron microscopy. *Food Systems*, 6(4), 547-553. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-6-4-547-553>

Для ЦИТИРОВАНИЯ: СМЫКОВ, И. Т. (2023). Электронно-микроскопические исследования кинетики структурообразования молочного геля. *Пищевые системы*, 6(4), 547-553. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-6-4-547-553>

1. Introduction

The central aspect in the technological process of cheese manufacture, one of main dairy products, resides in the milk gel formation. Numerous researchers from different countries dedicated their works to studying this process and defining optimal methodologies for regulating the gelation process in milk.

The process of rennet milk coagulation, according to the prevailing current opinion, can be subdivided into two partially overlapping main phases: the primary (enzymatic) phase, which involves the hydrolysis of κ -casein micelles resulting in the formation of paracasein and the partial aggregation of destabilized micelles; and the secondary (non-enzymatic) aggregation phase, which encompasses the complete aggregation of micelles into a cohesive spatial gel structure and its densification.

The enzymatic phase mechanism has been thoroughly explained in [1,2], with a quantitative understanding of its interaction with various environmental factors. In [3], it is demonstrated that during gelation, stronger bonds tend to substitute weaker bonds. This occurs due to the denaturation of micelle structures, which exposes new reactive centers according to a hierarchical order: *hydrophobic interactions* $\rightarrow$ *hydrogen bonds* $\rightarrow$ *electrostatic attraction* $\rightarrow$ *calcium bridges*. Additionally, the investigation highlights the ongoing relevance of determining how individual casein micelles contribute to the microstructure of milk curd.

In previous studies [4,5], researchers observed that enzymatic destabilization of casein micelles leads to their transformation into a “molten globule” state, accompanied by micelle swelling, which is visually clear through an increase in their size. It signifies the initial stage of subsequent conformational changes.

The initial aggregation of rennet-destabilized casein micelles during the enzymatic phase has been confirmed by electron microscopic photographs obtained by various researchers [6,7]. Furthermore, it is observed that cooperative transitions take place in casein molecules towards the end of the enzymatic phase. These transitions are a result of conformational changes that substantially alter the properties of casein micelles and their subsequent restructuring [8,7]. It is important to note that while these processes occurring with proteins in the gelation phase are often referred to as denaturation, caseins are rheomorphic proteins, meaning that their conformation depends on the surrounding environment. Therefore, it is more correct to describe the changes as conformational rather than denaturation.

The conformational changes in milk proteins and their kinetics, which play a crucial role in determining the characteristics of the final product, have been a subject of interest for many researchers [9,10]. However, the conformational changes of proteins within casein micelles induced by different milk-clotting enzymes and their specific effects on the properties of the resulting milk curd are still not sufficiently studied.

The understanding of the state of milk protein system near the gel point, specifically the transition mechanism from the primary gelation phase to the secondary phase, is still limited and not fully comprehended. At this stage, clusters of micelles or their aggregates reach a state where they are no longer actively engaged in random motion known as Brownian motion. Nevertheless, there must be a mechanism facilitating intensive interactions between these clusters, leading to the formation of a common structure.

In the secondary phase of rennet coagulation, which typically takes place under conditions of relative rest of the milk, there is continued aggregation of micelles that have undergone conformational changes. This aggregation process ultimately results in the formation and densification of a milk curd [11,12].

The mechanism of micelle aggregation in this phase can be described by the von Smoluchowski theory for diffusion-limited aggregation (DLA), according to some authors [13,14]. The theory suggests that the rate of aggregation is limited by particle diffusion, and it occurs through random collision and joining of particles of destabilized micelles [15].

The percolation model of gelation or the fractal model of cluster-cluster aggregation offer a broad understanding of the process, but they do not fully clarify how clusters of micelles from the primary phase interact with one another to form a unified spatial structure.

Researchers are increasingly recognizing the secondary gelation phase as including two substages: micellar aggregation and densification of the milk curd, resulting in the formation of a three-dimensional structure. In this context, paper [16] focuses on the primary descriptive models of gelation in milk. The findings reveal that the majority of these models solely address the micellar aggregation substage, neglecting the densification substage. However, more recent models are applicable to a broader range of conditions and accurately distinguish both substages.

Electron microscopy is extensively applied in numerous studies regarding the mechanism and kinetics of milk gel formation. Its usage enables the visualization of specific moments during these processes and

enhances our comprehension of gelation mechanism. Different methods of electron microscopy, such as transmission, scanning, and high resolution, are employed in these studies. In an early work [17], dedicated to electron microscopy analyses of milk proteins and dairy products, it was highlighted that a deeper understanding of how microstructure influences the properties of the final product enables the development of production processes focused on making high-quality products.

Modern researchers [18] confirm it and emphasize that analyzing the microstructure of cheeses at various stages of their production enhances the comprehension of manufacturing processes and the connection between cheese microstructure, product quality, and functionality. This understanding ultimately enables the optimization of production methods.

In [19], researchers examined the impact of high-pressure treatment on the microstructure of casein micelles in milk using electron microscopy. The findings revealed three phenomena associated with increasing pressure and processing time: the reduction in size of casein micelles, deformation and loss of their round shape, and the formation of agglomerated micelle fragments with more intense treatment (higher pressure and/or longer duration). This agglomeration resulted in an overall increase in the average diameter of micelles.

The microstructure of milk curd samples was examined [20] using transmission and scanning electron microscopy. The results of this study prove a notable interaction between coagulation temperature and the coagulation characteristics of milk protein, which requires certain modifications in cheesemaking procedures. It is worth mentioning that reducing the coagulation temperature significantly alters the microstructure of the milk curd, leading to a decreased tendency for syneresis during curd cutting.

Exciting advancements in research methodologies are becoming more prevalent, enabling us to get supplementary knowledge regarding the intricate transformations that occur within protein microstructures during the manufacture of dairy products. Consequently, to investigate the impact of endogenous milk protein additives on the microstructure and properties of milk gels, a super-resolution microscopy technique called Stimulated Emission Depletion (STED) was used [21].

The effect of temperature on the structure of casein micelles and the gelation process in milk was examined through the use of transmission electron microscopy and field emission scanning electron microscopy (FESEM) in [22]. The findings revealed a clear correlation between the temperature, microstructure of casein micelles, and the gelation characteristics of cow's milk.

The impact of pH on the microstructure of casein micelles was studied in [23] using direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM). dSTORM-visualization of casein micelle aggregates at a pH of 4.5, which was below the isoelectric point of caseins, demonstrated that β -casein dispersed throughout the protein network and revealed minuscule pores within the structure at the nanoscale level.

Super-resolution microscopy is a powerful method for analyzing the microstructure of complex colloidal systems in conditions that closely resemble their natural state. In a study cited as [24], Coherent Anti-Stokes Raman Scattering microscopy (CARS) showed that the use of fluorescent dye during the preparation of milk gel does not affect the visualization of its microstructure, while offering exceptionally high resolution.

In relation to electron microscopy, diverse techniques are used to prepare specimens for research. The researcher's selection of a particular area of interest within the sample also holds significant importance. Nevertheless, the process of choosing microscopy methods and preparing specimens unavoidably gives rise to preparation artifacts and challenges in accurately interpreting the resulting images.

In [25], three techniques were applied to prepare specimens for studying milk proteins using transmission electron microscopy, aiming to assess and eliminate preparation artifacts while gaining supplementary insights. Research findings indicate that utilizing the ultra-fast freeze-chip method, as opposed to fixation with glutaraldehyde, enables the visualization of finer structures within milk's casein micelles.

Even with the multitude of techniques available for investigating the microstructure of milk gel and the diverse specimen preparation methods used, it is notable that the majority of studies focus solely on either the morphology and microstructure of casein micelles or the microstructure of the completed milk curd, encompassing its initial and final states. Intermediate states are typically depicted solely through theoretical models. A comprehensive depiction of the development of milk gel microstructure during enzymatic gelation, substantiated by (electron) microscopic images confirming this evolution, is currently missing.

The primary objective of this study is to enhance comprehension of the process of enzymatic gelation in milk and to visually depict the evolution of the microstructure of rennet milk gel through the application

of transmission electron microscopy and a range of specimen preparation methods.

2. Objects and methods

2.1. Materials

The research used the following:

- ❑ milk sourced from AgriVolga LLC, the village of Burmasovo, Uglich district, Yaroslavl region, Russia, the Yaroslavskaya cow breed, with a raw milk fat content ranging from 4% to 4.2% and protein content between 3.4% and 3.7%;
- ❑ milk-clotting enzyme of Chy-max® M 1000 Liquid, manufactured by Chr Hansen A/S, based in Hoersholm, Denmark.

2.2. Methods

2.2.1. Milk preparation

The milk underwent pre-treatment, which involved heating to 40 ± 1 °C and standardizing it by adjusting the casein/fat ratio to 0.7. The milk pasteurization was carried out in a tank at a temperature of 68 ± 1 °C for 10 minutes, followed by cooling to a temperature of 36 ± 1 °C. Enzymatic coagulation was then initiated by adding the enzyme at a ratio of 0.0025–0.0075% and stirring the milk for 2 minutes. The milk coagulation process took place at a temperature of 35 ± 1 °C.

2.2.2. Electron microscopy

Electron microscopic examinations of the microstructure of milk components and milk gel were conducted using an EM-410 transmission electron microscope (Philips, the Netherlands). To minimize distortions caused by the microscope's electron beam on the sample, investigations were performed using the microscope's electron beam at a minimal current and a voltage of 40 kV.

Three different methods were used for preparing specimens for electron microscopy:

I. Shading of surface topography by vacuum deposition of heavy metal (MS)

Milk samples, obtained from a common reservoir at specific time intervals after adding rennet, were fixed at room temperature using a 2% glutaraldehyde solution in 0.1 M Sorenson phosphate buffer with a pH of 7.2 for 20 minutes (0.1 ml milk to 1 ml fixative). Subsequently, the fixed samples were diluted with distilled water at a ratio of 1:100. A 5 µl drop of the diluted, fixed sample was then transferred using a pipette onto a 400-mesh copper grid coated with nitrocellulose film (parlodium) and held for 2 minutes. Afterward, excess solution was removed from the grid's surface with filter paper, and the grid was dried in a vacuum chamber at room temperature. To enhance sample contrast, a 3–5 nm thick layer of platinum (Pt) was deposited on the sample's surface at a 24° angle using vacuum metal sputtering in a vacuum chamber [26]. The thickness of the applied metal was monitored using a quartz sensor. The completed sample, featuring shadows reflecting its surface topography due to the metal deposition, was then ready for examination in the electron microscope.

II. Negative staining of the preparation with a heavy metal solution (NS)

Samples of milk were collected from a common reservoir at specific time intervals after adding the rennet enzyme. All selected specimens were fixed at room temperature using a 2% glutaraldehyde solution in 0.1 M Sorenson phosphate buffer at pH 7.2 for 20 minutes (at a ratio of 0.1 ml of milk to 1 ml of fixative). Subsequently, the fixed samples were diluted with distilled water at a ratio of 1:100.

A 5 µl drop of the fixed sample was pipetted and transferred onto a copper grid coated with a nitrocellulose film (parlodium) and held for 2 minutes to ensure dispersed particles adhered to the film's surface. To enhance contrast, negative staining was employed by pipetting a 2 µl drop of a 4% uranyl acetate solution onto the fixed sample on the grid and holding for 4 minutes [27,28]. Excess solution was removed with filter paper, and the grid was dried in a vacuum chamber at room temperature. The resulting sample was transferred to an electron microscope for analysis.

III. Frozen Fracture Replication (FFR)

Gel samples were collected at distinct stages of its formation. The samples were carefully taken from the milk gel as minimally deformed parallelepipeds and placed into specially prepared tanks measuring about $2 \times 2 \times 8$ mm made of aluminum foil.

To freeze the samples, a precisely controlled process was employed using a polished copper block cooled with liquid nitrogen to a temperature of -180 °C. The freezing rate was maintained at no less than -100 °C s⁻¹ to prevent the formation of ice crystals in the sample. Subsequently, the frozen

sample was placed in a cold vacuum chamber, where it was split crosswise at a temperature of -170 °C and held for one minute to remove surface ice.

To obtain a contrasting replica of the prepared cleavage surface of a milk gel sample, a 3–5 nm thick layer of platinum (Pt) was applied to the sample's surface at a 24° angle and a temperature of -130 °C in a vacuum chamber using thermal vacuum metal sputtering. Subsequently, to obtain a durable replica, a layer of carbon (C) with a thickness of 20–30 nm was also applied at a 90° angle. The thickness of the applied material was controlled by a quartz sensor.

After the replica was applied to the cold cleaved sample, it was promptly removed from the vacuum chamber and separated from the sample using a heated sodium hypochlorite (NaOCl) solution and then washed with toluene, acetone, and ethanol. Finally, it was rinsed with distilled water. The resulting finished replica of the cleavage surface of the milk gel sample was placed on a 400-mesh copper grid and transferred to an electron microscope for research.

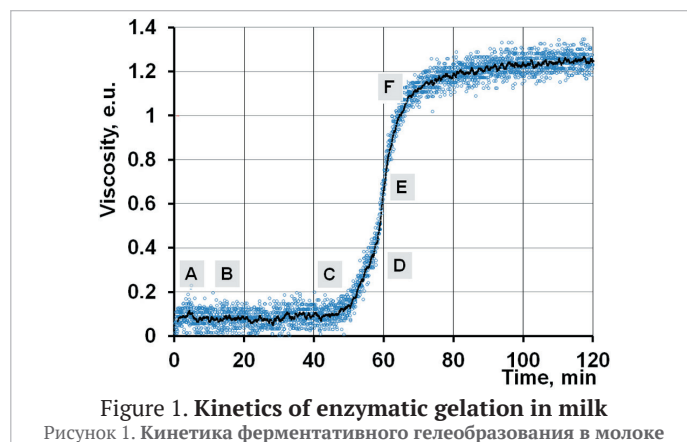
Images of the microstructure of the prepared specimens, captured at various magnifications using an electron microscope, were then analyzed. At each stage of the study, at least ten obtained images were analyzed, and the most representative ones were selected for further examination and analysis.

3. Results and discussion

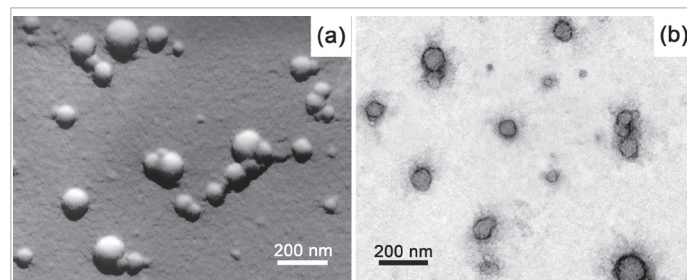
Electron microscopy provides a means to visually observe changes in casein micelles and their interactions during the gelation process in milk. This can be achieved using different specimen preparation methods for microscopy. However, the selection of research methods and specimen preparation techniques for microscopy invariably introduces the possibility of preparation artifacts and challenges in interpreting the resulting images.

In this study, the use of three distinct specimen preparation methods allowed for a reduction in the influence of preparation artifacts on research result interpretation. Consequently, it enhanced our understanding of the intricate mechanism underlying enzymatic gelation in milk.

For microscopy specimen preparation, milk samples were obtained at specific time points denoted by letters in Figure 1, which represents the gelation kinetics of milk due to enzymatic activity. These time points were selected based on previous literature highlighting significant changes in the resulting gel during milk gelation.



In Figure 2, the electron microscopy images captured at time point (A) depict casein micelles in the original pasteurized milk. Image (a) in this figure was generated using heavy metal shading (MS), which effectively reveals the micelles as spherical structures of different sizes. This observation aligns with the widely accepted notion of their typical shape.



The utilization of the negative contrast (NS) technique with uranyl acetate in the specimen allowed for the generation of image (b), which reveals that the ideal spherical shape of the casein micelles is not accurate and demonstrates the existence of a specific shell (hydrophilic hairbrush), on the micellar surface, that in general is not uniform. In a previous study [15], the presence of a casein macropeptide brush on the micellar surface was noted, although it was depicted as uniform. This unevenness indicates that different areas of the micelles have various levels of hydrophilicity. However, this unevenness specifies that in the original milk, as clear from both images, dimers and trimers of micelles, formed due to weak hydrophobic interactions, may also be present.

However, both methods of specimen preparation mentioned have a notable drawback: they require preliminary chemical treatment and strong dilution of the solution. These processes can potentially introduce preparation artifacts and prevent an accurate assessment of the micelles' native state and volume distribution in milk. The presence of dimer and trimer micelles observed in the images could possibly be attributed to such artifacts, thus additional research using a different, non-destructive method is required. Figure 3 presents an image that demonstrates the distribution of micelles across a microvolume of milk. This image was generated using the ultra-fast freezing-fracture method (FFR) for specimen preparation, which enables the preservation of the micelles' native state and volume distribution.

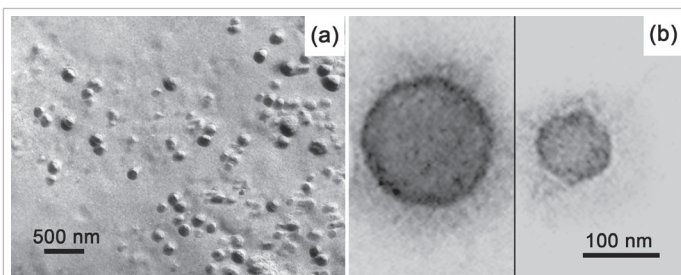


Figure 3. Distribution of micelles over a microvolume of milk (a) – FFR method; (b) – enlarged images of casein micelles – NS method

Рисунок 3. Распределения мицелл по микрообъему молока (а) – метод FFR; (б) – увеличенные изображения мицелл казеина – метод NS

The image presented in Figure 3(a) provides evidence supporting the presence of dimers and trimers of casein micelles in milk, as also observed in Figure 2; perhaps they are weakly bound by hydrophobic interactions, but they are not regarded as mere preparation artifacts. Though there may be debates among researchers regarding the existence of these dimers and trimers in natural milk. Figure 3(a), despite its clear simplicity, necessitates careful analysis and addresses a significant question. In the realm of statistical thermodynamics, most researchers view milk as an equilibrium disperse system. This implies that the dispersed particles (casein micelles) should be uniformly distributed throughout the entire volume, i. e., the level of fluctuations in their location should be minimum from a thermodynamic perspective. However, as evident from the image and several similar ones we have obtained, the distribution of casein micelles in reality is highly uneven across the milk volume. Some areas contain a considerable number of micelles, while others exhibit an absence of micelles altogether. Importantly, this is not a result of preparation artifacts. These observations lead to two conclusions. Theoretical conclusion: milk can be considered as a nonequilibrium system; and practical one: gelation primarily initiates in areas where casein micelles accumulate, forming primary clusters of micelles. These findings contribute to a deeper understanding of the gelation mechanism in milk.

Figure 3(b) displays high-magnification images of two casein micelles with different sizes. It is evident that both micelles show a complex internal structure, similar to the images described in [29]. While these images are occasionally interpreted as evidence of submicellar structure within casein micelles, it is more probable that they signify the complex nature of the overall micelle structure. Furthermore, the image clearly shows a halo surrounding the micelles. However, this image clearly shows a halo, framing the micelles, but these are not glycomacropeptides, which are much smaller in size, but the area of their interaction with the environment.

The widely-held belief among researchers is that the structure of rennet milk gel can be described as a spatial (three-dimensional) network of casein micelle chains. This notion is often supported by repeated artistic illustrations (models), suggesting that individual micelles form chains during the initial stages of enzymatic gelation. However, experimental data from various researchers have revealed contradictions to the tradi-

tional views on the gel structure. In our opinion, this prevailing belief is erroneous for two reasons. Firstly, systems inherently strive to minimize free energy, and the formation of chains becomes energetically unfavorable when glycomacropeptides are uniformly removed from the micelle surface. Instead, it is more plausible that these glycomacropeptides are randomly clustered together. Secondly, the formation of primary chains would require an anisometric arrangement of hydrophobic areas on the micelle surface, which is unlikely, unsupported by observations, and lacks confirmation from any evidence. The photographs in Figure 4 illustrate the formation of small, loosely bound clusters of micelles during the initial phase of enzymatic gelation, represented at time point (B) in Figure 1.

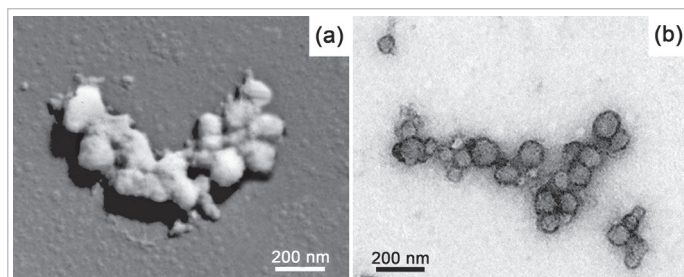


Figure 4. Formation of clusters of casein micelles in the primary gelation phase. Methods: (a) – MS, (b) – NS

Рисунок 4. Образование кластеров мицелл казеина в первичной фазе гелеобразования. Методы: (а) – MS, (б) – NS

At this moment, the milk-clotting enzyme molecules eliminated the glycomacropeptides of κ -casein from the surface of some micelles and formed a hairy layer with hydrophilic properties on the surface of the micelles. Consequently, the surface of the micelle (or a part of it) turned into a hydrophobic surface, which is not energetically favorable for the dispersed system. To reduce its free energy, the system aims to minimize the size of free hydrophobic areas by connecting micelles into clusters through hydrophobic interactions. Figure 4(a) and Figure 4(b), obtained using different methods, clearly show the formation of these loosely bound micelle clusters. However, the presence of any chains is not evident.

Figure 5 displays images of large clusters of casein micelles observed at time point (C) in Figure 1, marking the end of the initial stage of enzymatic gelation. By this time, approximately 80–90% of the glycomacropeptides attached to the micelles' surface were removed by the milk-clotting enzymes. Images obtained through various techniques reveal that the majority of micelles are arranged in large, loosely connected clusters. It's important to mention that despite these changes, the viscosity of the milk remains relatively unchanged throughout the primary gelation phase. This can be attributed to the well-known Einstein formula (1), which states that the viscosity η of a dispersed system is solely dependent on the volume fraction of the dispersed phase, rather than the sizes of non-interacting particles.

$$\eta = \eta_0 (1 + 2,5\varphi) \quad (1)$$

where η_0 is the viscosity of the dispersion medium, φ is the volume fraction of the dispersed phase.

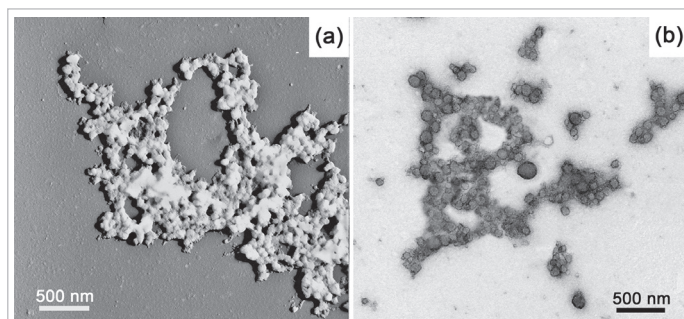


Figure 5. Clusters of casein micelles at the end of the primary gelation phase. Methods: (a) – MS, (b) – NS

Рисунок 5. Кластеры мицелл казеина в конце первичной фазы гелеобразования. Методы: (а) – MS, (б) – NS

The electron microscopic studies of the gelation process at this stage yield results that are consistent with earlier findings in [30,31] obtained through different methods and indicate the occurrence of a clustering process of casein micelles as a preliminary step prior to coagulation.

Regarding the timeframe, the formation of large clusters of casein micelles occurs around the “gel point”, which refers to the moment when the viscosity of the dispersed system rapidly increases. Consequently, investigations were conducted on the microstructure of the resulting gel immediately after reaching the gel point (time point D — Figure 1). Figure 6 presents electron microscopy images depicting the state of casein micelle clusters at this specific time.

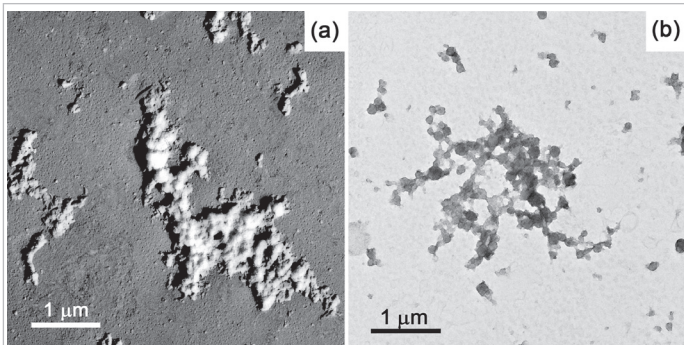


Figure 6. Clusters of casein micelles at the beginning of the secondary gelation phase Methods: (a) — MS, (b) — NS

Рисунок 6. Кластеры мицелл казеина в начале вторичной фазы гелеобразования Методы: (a) — MS, (b) — NS

Based on the photographs and a comparison with Figure 5, it is evident that both the micelles within the clusters and the clusters themselves experienced notable structural alterations after reaching the gel point. Prior to the gel point, the micelles maintained a spherical shape, and the bonds between them in the clusters were relatively weak (hydrophobic). However, after the gel point, only a few spherical micelles remained within the clusters, with some disintegrating, unfolding, and forming multiple intermicellar bonds.

Our observation suggests that during the final stage of the primary gelation phase, there is a cooperative conformational transition similar to a second-order phase transition in casein molecules, forming micelles and clusters of micelles. This transition has two main effects: first, the increase in micelle size due to enhanced hydration and volume fraction, resulting in a slight viscosity increase, and, secondly, the significant alteration of physicochemical properties of the micelles, facilitating the formation of a cohesive milk gel structure. Loosely bound micelle clusters transform into coherent aggregates of remaining micelles and protein particles after the conformational transition. These aggregates gradually become denser through fluctuation, oscillatory, and rotational movements of casein micelles and protein particles within the aggregate, leading to the formation of additional intermicellar bonds. Subsequently, these aggregates serve as the starting materials for the formation of the three-dimensional spatial structure of the milk gel in the secondary phase. This viewpoint is supported by the analysis of a series of gel state images at the end of the secondary gelation phase. Figure 7 displays photographs capturing the progression of casein micelles clustering into a cohesive structure. The photographs vividly show the formation of small micelle aggregates, their mutual interactions, and the subsequent emergence of a unified structure.

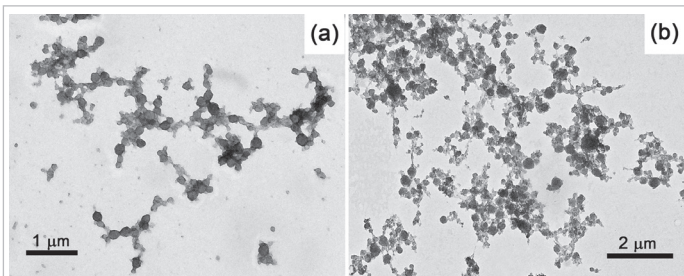


Figure 7. Interaction of aggregates of casein micelles during the formation of an integral structure. Methods: (a), (b) — NS

Рисунок 7. Взаимодействие агрегатов мицелл казеина при образовании целостной структуры. Методы: (a), (b) — NS

The studies conducted prove a notable drawback despite their apparent clarity. The method employed for direct transmission electron microscopy involves the deposition of dispersed particles on a flat substrate, resulting in significant deformation of the particles. Consequently, the

three-dimensional structure of clusters and aggregates can only be inferred from their two-dimensional representations in photographs. Furthermore, this method proves inadequate for assessing the evolution of gel structure during coagulation and syneresis, as the structural deformations become catastrophic in nature. Therefore, alternative methods are necessary to examine these changes. In [32], scanning electron microscopy was used to capture images of the structure of the final milk gel. The findings clearly illustrate that the gel primarily consists of aggregates (flakes) formed by micelles and protein particles rather than chains of micelles, which aligns with our own results.

Our investigation into the microstructure of the milk gel using the ultrafast freeze-cleavage transmission electron microscopy method showed similar results (Figure 8(a)). If the image obtained by scanning electron microscopy provides a comprehensive view with a large depth of field, allowing for a quasi-three-dimensional assessment of the structure, transmission electron microscopy presents an image of a random cross-sectional cleavage of the structure of studied sample. It is highly unlikely that such a random cleavage would consistently pass through chains of micelles. Thus, the photograph presented above depicts a cross-sectional cleavage of the spatial structure formed by aggregates of micelles. It is important to note that the gel's characteristic size can be influenced by the size of the gel's unit cell, which varies based on the properties of the milk and the processing techniques used. In this case, the cells have an average size of approximately 5 µm, which is similar to the characteristic sizes of micelle clusters near the gelation point. Evidently, this size affects the gel's permeability and, accordingly, the rate of syneresis.

Figure 8(b) illustrates the location of the milk fat globule within the milk gel structure. This photograph demonstrates that the fat globule, as it undergoes the gelation process, gets a secondary protein shell, which serves as a protective measure for the fat against lipolysis during the storage of cheese.

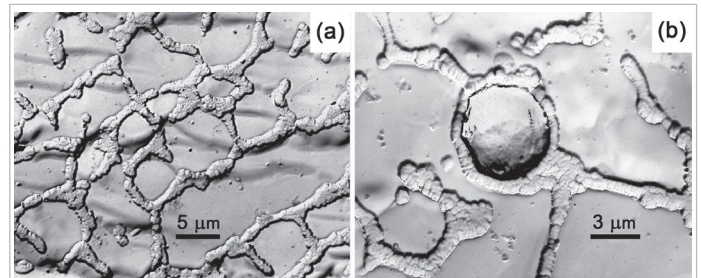


Figure 8. Structure of milk gel. FFR method

Рисунок 8. Структура молочного геля. Метод FFR

Therefore, the experimental confirmation of the hypothesis that the composition of rennet milk gel consists of sequential chains of distinct casein micelles is absent, thus rendering it an inadequate description of the gel structure. Instead, it can be proposed that milk gel structuring occurs on two levels: localized structuring within clusters of micelles and overall structuring of a pre-existing cluster system. It is highly probable that the final gel structure is formed during the coagulation process through the aggregation of pre-formed aggregates of casein micelles.

To complete the description of the milk gel structure, it is crucial to elucidate its topological characteristics. The key aspect to consider is that the topology of the resulting structure should minimize the energy of the phase interface during the sol-gel transition. During enzymatic gelation, para-κ-casein, which has a notable hydrophobic nature, is formed. Namely, an additional phase interface appears, leading to an increase in free (excess) interphase energy. According to the Gibbs-Helmholtz principle, this energy tends to spontaneously decrease in dispersed systems. As a result, the entropy of the system decreases due to the increased proportion of ordered entities within the surrounding water structure. The hydrophobic interactions between para-κ-casein molecules and water molecules contribute to an increase in entropy and the system transition to a more favorable energetic state. Furthermore, the combination of micelles into a single, compact structure is advantageous in terms of energy dynamics for the system. This combination minimizes contact of hydrophobic areas with water, and, consequently, the interaction of identical hydrophobic areas also contributes to a reduction in the system's overall free energy. The process of diminishing interfacial energy is further facilitated through the aggregation of micelles, which goes with a decline in free surface energy as a consequence of decreased specific surface area of dispersed phases upon intermolecular contacts among the micelles' hydrophobic areas. Additionally, the formation of a curd at specific stages involves the participation of ionic, hydrogen, and van der Waals bonds.

During the process of gelation, milk undergoes a transition from a stable dispersed state to a metastable state. The phase separation of the metastable system does not occur through the emergence of nuclei of two finished phases followed by competitive growth, as assumed in the chain model. Instead, it is attributed to the initial formation of numerous small nonequilibrium areas (clusters) within the metastable system, which show slight variations in concentration and have the ability to gradually merge and approach an equilibrium state. Consequently, the transformation of the dispersed system (milk) into a structured one (milk curd) occurs as a result of this process.

From the perspective outlined, the milk curd can be characterized within the realm of scientific discourse as a bicontinuum system. There one continuum corresponds to whey, while the other continuum relates to a structured protein matrix. These continua permeate each other mutually. The main condition for the emergence, existence, and development of this system lies in the organization of its topology, prioritizing the minimization of the interface between the continua. The conversion of milk into a milk curd occurs under the influence of deterministic and stochastic factors. Deterministic processes dictate the fundamental nature and properties of the curd's topology, whereas stochastic processes govern their distortion or dispersion within a specific confidence interval.

4. Conclusion

Based on the conducted research, the following conclusions can be drawn.

From the perspective of statistical thermodynamics, natural milk shows characteristics of a non-equilibrium system, as proved by the uneven distribution of casein micelles throughout its volume.

The uneven distribution of a glycomacropeptide hair layer on the surface of casein micelles in milk contributes to the generation of dimer and trimer micelles.

During the initial phase of enzymatic gelation in milk, loosely bound clusters of micelles form at areas of the highest micelle concentration. Due to the weak nature of these hydrophobic bonds, these clusters have minimal impact on the viscosity changes observed in milk. The formation of micelle chains does not occur at this stage, which can be attributed to the absence of micelle anisometry, and the energetic disadvantage associated with their formation.

During the enzymatic gelation process in milk near the gel point, a hierarchical transformation process of the protein component of milk is activated. The trigger mechanism for this process is a cooperative conformational phase transition in clusters of casein micelles, leading to a sequential chain of increasingly energy-intensive reactions in the order: *hydrophobic interactions* → *hydrogen bonds* → *electrostatic attraction* → *calcium bridges*. The result is the conversion of loosely-bound micelle clusters into more densely packed aggregates.

Ultimately, the resulting milk curd predominantly consists of individual aggregates and constitutes a bicontinuous system. In this system, one continuous phase is the whey while the other continuous phase is a structured protein matrix. These two phases permeate each other mutually.

Generally, the gelation phenomenon in milk can be conceptualized as an energy-reducing process. Investigating the correlation between the reduction in milk's free energy during gelation and the physical characteristics of the final cheese and other dairy products continues to be an ongoing subject of scientific inquiry.

REFERENCES

- Lucey, J. A. (2011). Rennet-induced coagulation of milk. Chapter in a book: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Academic Press. 2011.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, New York. 2017.
- Amaro-Hernández, J. C., Olivas, G. I., Acosta-Muñoz, C. H., Gutiérrez-Méndez, N., Ríos-Velasco, C., Sepulveda, D. R. (2022). Chemical interactions among caseins during rennet coagulation of milk. *Journal of Dairy Science*, 105(2), 981–989. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21071>
- Pittsytyn, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. Chapter in a book: *Advances in Protein Chemistry*. 1995. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60546-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60546-X)
- Farrell Jr., H. M., Qi, P. X., Brown, E. M., Cooke, P. H., Tunick, M. H., Wickham, E. D. et al. (2002). Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships. *Journal of Dairy Science*, 85(3), 459–471. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74096-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74096-4)
- Fox, P. F., Guinee, T. P. (2013). *Cheese science and technology*. Chapter in a book: *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Oxford, Wiley Blackwell. 2013.
- Smykov, I. T. (2015). Kinetics of Milk Gelation. Part I. Coagulation Mechanism. Chapter in a book: *Rheology: Principles, applications and environmental impacts*. New York: Nova Science Publ. 2015.
- Surkov, B. A., Klimovskii, I. I., Krayushkin, V. A. (1982). Turbidimetric study of kinetics and mechanism of milk clotting by rennet. *Milchwissenschaft*, 37, 393–395.
- Mosler, A. B., Shaqfeh, E. S. G. (1997). The conformation change of model polymers in stochastic flow fields: Flow through fixed beds. *Physics of Fluids*, 9, 1222–1234. <https://doi.org/10.1063/1.869262>
- Markoska, T., Vasiljevic, T., Huppertz, T. (2020). Unravelling conformational aspects of milk protein structure-contributions from nuclear magnetic resonance studies. *Foods*, 9(8), Article 1128. <https://doi.org/10.3390/foods9081128>
- Horne, D. S., Lucey, J. A. (2017). Rennet-Induced Coagulation of Milk. Chapter in a book: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Oxford: Academic Press. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00005-3>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2016). *Enzymatic Coagulation of Milk*. pp.185–229. Chapter in a book: *Fundamentals of Cheese Science*, Springer Nature, New York. 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7
- Tuszynski, W. B. (1971). A kinetic model of the clotting of casein by rennet. *Journal of Dairy Research*, 38(2), 115–125. <https://doi.org/10.1017/S0022029900019233>
- Witten Jr., T. A., Meakin, P. (1983). Diffusion-limited aggregation at multiple growth sites. *Physical Review B*, 28(10), 5632–5642. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.28.5632>
- De Kruijf, C. G., Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. Chapter in a book: *Advanced Dairy Chemistry — 1 Proteins*. Springer, Boston, MA. 2003.
- Salvador, D., Acosta, Y., Zamora, A., Castillo, M. (2022). Rennet-induced casein micelle aggregation models: A review. *Foods*. 11(9), Article 1243. <https://doi.org/10.3390/foods11091243>
- Kalab, M. (1979). Microstructure of dairy foods. 1. Milk products based on protein. *Journal of Dairy Science*, 62(8), 1352–1364.
- Ong, L., Li, X., Ong, A., Gras, S. L. (2022). New insights into cheese microstructure. *Annual Review of Food Science and Technology*, 13, 89–115. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051812>
- Serna-Hernandez, S. O., Escobedo-Avellaneda, Z., García-García, R., Rostro-Alanis, M. D. de J., Welti-Chanes, J. (2022). Microscopical evaluation of the effects of high-pressure processing on milk casein micelles. *Molecules*, 27, Article 7179. <https://doi.org/10.3390/molecules27217179>
- Panthi, R. R., Kelly, A. L., Sheehan, J. J., Bulbul, K., Vollmer, A.H., McMahon, D. J. (2019). Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 177–189. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15039>
- Li, R., Ebbesen, M. F., Glover, Z. J., Jøger, T. C., Rovers, T. A. M., Svensson, B. et al. (2023). Discriminating between different proteins in the microstructure of acidified milk gels by super-resolution microscopy. *Food Hydrocolloids*, 138, Article 108468. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108468>
- Zhang, Y., Liu, D., Liu, X., Hang, F., Zhou, P., Zhao, J. et al. (2018). Effect of temperature on casein micelle composition and gelation of bovine milk. *International Dairy Journal*, 78, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.10.008>
- Foroutanparsa, S., Bröls, M., Tas, R. P., Maljaars, C. E. P., Voets, I. K. (2021). Super resolution microscopy imaging of pH induced changes in the microstructure of casein micelles. *Food Structure*, 30, Article 100231. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100231>
- Glover, Z. J., Ersch, C., Andersen, U., Holmes, M. J., Povey, M. J., Brewer, J. R. et al. (2019). Super-resolution microscopy and empirically validated autocorrelation image analysis discriminates microstructures of dairy derived gels. *Food Hydrocolloids*, 90, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.004>
- Karlsson, A. O., Ipsen, R., Ardo, Y. (2007). Observations of casein micelles in skim milk concentrate by transmission electron microscopy. *LWT — Food Science and Technology*, 40(6), 1102–1107. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.05.012>
- Matsko, N., Letofsky-Papst, I., Albu, M., Mittal, V. (2013). An analytical technique to extract surface information of negatively stained or heavy-metal shadowed organic materials within the TEM. *Microscopy and Microanalysis*, 19(3), 642–651. <https://doi.org/10.1017/S1431927613000366>
- Kavanagh, G. M., Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH β -Lactoglobulin gels. *Langmuir*, 16, 24, 9584–9594. <https://doi.org/10.1021/la0004698>
- Hayat, M. A. (2000). *Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications*. Cambridge University Press. 2000.
- Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P., Goff, H. D. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14(12), 1025–1031. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.008>
- Casanova, H., Chen, J., Dickinson, E., Murray, B. S., Nelson, P. V., Whittle, M. (2000). Dynamic colloidal interactions between protein stabilized particles — experiment and simulation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(17), 3861–3869. <https://doi.org/10.1039/b0040231>
- de Kruijf, C. G. (1998). Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 3019–3028. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75866-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75866-7)
- Shamsi, K. (2008). Effects of Pulsed Electric Field Processing on Microbial, Enzymatic and Physical Attributes of Milk and the Rennet-Induced Milk Gel. RMIT University, Melbourne. 2008.

AUTHOR INFORMATION		СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	
Affiliation		Принадлежность к организации	
Igor T. Smykov , Doctor of Technical Sciences, Chief Researcher, Department of Physical Chemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-48532-9-81-21 E-mail: i_smykov@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5663-3662		Смыков Игорь Тимофеевич — доктор технических наук, главный научный сотрудник, Отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-48532-9-81-21 E-mail: i_smykov@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5663-3662	
Contribution		Критерии авторства	
Completely prepared the manuscript and is responsible for plagiarism.		Автор самостоятельно подготовил рукопись и несет ответственность за плагиат.	
Conflict of interest		Конфликт интересов	
The author declares no conflict of interest.		Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.	

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-554-560>

Поступила 21.07.2023

Поступила после рецензирования 20.12.2023

Принята в печать 22.12.2023

© Юраскина Т. В., Соколова Е. Н., Фурсова Н. А., Серба Е. М., 2023



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ИННОВАЦИОННЫЙ ПОДХОД К ОБОГАЩЕНИЮ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Юраскина Т. В.^{*}, Соколова Е. Н., Фурсова Н. А., Серба Е. М.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

хлебопекарные
дрожжи,
микроэлементы,
пищевые
ингредиенты,
Saccharomyces
cerevisiae

В настоящее время актуальной остается проблема дефицита макро- и микронутриентов в рационах населения. Одним из перспективных направлений ее решения является разработка способов производства отечественных пищевых ингредиентов с целью создания на их основе обогащенных микронутриентами пищевых продуктов. Биотехнологический способ получения таких ингредиентов считается одним из актуальных, а наиболее широко применяемым микроорганизмом в пищевой промышленности являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Целью данной работы стало изучение возможности обогащения хлебопекарных дрожжей микроэлементами: цинком и хромом. В ходе исследования подтверждена возможность фортификации дрожжей в процессе культивирования периодическим способом на солодовом сусле с добавлением растворов солей — источников микроэлементов: сульфата цинка ($\text{ZnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) и хлорида хрома (III) ($\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$). Оптимальными дозировками выбранных солей микроэлементов для обогащения были 250 мг Zn/дм³ и 500 мкг Cr/дм³. При этом наблюдалось увеличение содержания сырого протеина (СП) на 11,6±0,5%. При использовании данного сочетания (250 мг Zn/дм³ + 500 мкг Cr/дм³) удалось достичь оптимальных результатов в процессе одновременного обогащения объекта двумя микроэлементами. Это позволило получить образец с концентрацией 263,4±13 мг Zn/100 г дрожжей (процент встраивания — 58,8%) и 308,2±15 мкг Cr/100 г дрожжей (процент встраивания — 34,4%). Также наблюдалось повышение количества сырого протеина на 30±1,5%. Была изучена возможность включения полученных экспериментальных образцов в состав пищевых продуктов, и в качестве модели было выбрано изделие массового потребления — хлеб. Образцы хлеба были произведены с полной заменой дрожжей без обогащения на фортифицированные цинком и хромом. Органолептическая оценка и исследование таких важных показателей, как влажность и кислотность, продемонстрировали, что экспериментальные образцы могут быть использованы в пищевой промышленности после прохождения необходимых тестов на безопасность. Для восполнения рекомендуемой суточной нормы поступления в организм микроэлементов при употреблении 100 г экспериментального образца хлеба были рассчитаны значения: 68,5±3,4% для цинка и 19,2±1,0% для хрома.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания № 0410-2022-0006.

Received 21.07.2023

Accepted in revised 20.12.2023

Accepted for publication 22.12.2023

© Yuraskina T. V., Sokolova E. N., Fursova N. A., Serba E. M., 2023

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

AN INNOVATIVE APPROACH TO FOOD FORTIFICATION USING BAKER'S YEAST

Tatyana V. Yuraskina^{*}, Elena N. Sokolova, Natalya A. Fursova, Elena M. Serba

Russian Research Institute of Food Biotechnology is a Branch of Federal State Budget Institution of science "Federal Research Center of Food, Biotechnology and Food Safety", Moscow, Russia

KEY WORDS:

baker's yeast,
trace elements,
food ingredients,
Saccharomyces
cerevisiae

ABSTRACT

Currently, the problem of deficiency of macro- and micronutrients in the diet of the population remains relevant. One of the promising areas for solving this problem is the development of methods for the production of domestic food ingredients with the aim of creating food products fortified with microelements on their basis. The biotechnological method for production of such ingredients is considered one of the most relevant. The most widely used microorganism in the food industry is the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The aim of the research was to study the possibility of baker's yeast enrichment with microelements: zinc and chromium. The possibility of yeast fortification during batch fermentation on malt wort with the addition of salt solutions — sources of trace elements (zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) and chromium (III) chloride ($\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)) was confirmed. The optimal dosages of the selected trace element salts for fortification were 250 mg Zn/dm³ and 500 µg Cr/dm³. An increase in the crude protein content by 11.6±0.5% was also observed. When using this combination (250 mg Zn/dm³ + 500 µg Cr/dm³), it was possible to reach optimal results in the process of simultaneous enrichment of the object with two microelements. It makes possible to obtain a sample with a concentration of 263.4±13 mg Zn/100 g of yeast (percentage of incorporation was 58.8%) and 308.2±15 µg Cr/100 g of yeast (percentage of incorporation was 34.4%). An increase in the crude protein content by 30±1.5% was also observed. The possibility of including the produced experimental samples in food products was studied. Bread as a mass consumer product was chosen as a model. Experimental bread samples were produced with a complete replacement of yeast without enrichment with yeast fortified with zinc and chromium. Organoleptic evaluation and study of important parameters such as moisture and acidity demonstrated that the experimental samples can be used in the food industry after passing the necessary safety tests. The values of replenishing the norms of physiological needs in microelements when consuming 100 g of the experimental bread sample were calculated: 68.5±3.4% for zinc and 19.2±1.0% for chromium.

FUNDING: The research was funded by State Assignment № 0410-2022-0006.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Юраскина, Т. В., Соколова, Е. Н., Фурсова, Н. А., Серба, Е. М. (2023). Инновационный подход к обогащению пищевых продуктов с применением хлебопекарных дрожжей. *Пищевые системы*, 6(4), 554-560. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-554-560>

FOR CITATION: Yuraskina, T. V., Sokolova, E. N., Fursova, N. A., Serba, E. M. (2023). An innovative approach to food fortification using baker's yeast. *Food Systems*, 6(4), 554-560. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-554-560>

1. Введение

В настоящее время перспективным направлением развития пищевой промышленности является получение новых отечественных натуральных пищевых ингредиентов. Одним из возможных способов их производства является биотехнология, позволяющая с минимальными усилиями достичь заданных свойств конечной продукции [1,2]. Широко используемыми биологическими объектами в пищевой отрасли являются дрожжи [1,2]. Дрожжи применяют в качестве ведущего элемента в производстве хлебобулочных изделий и этанола, в пивоварении, виноделии, и т. д. Также дрожжи используют в качестве источника биологически ценных компонентов, таких как белок, витамины группы В, провитамин D₂ и др. Стоит отметить, что скор незаменимых аминокислот у дрожжевых белков приближен к содержанию данных аминокислот в белках животного происхождения [3,4]. Хлебопекарные дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae* считаются подробно изученными микроорганизмами, что позволяет использовать их в качестве модельного объекта для различных исследований [5]. Особенностью *S. cerevisiae* является высокая лабильность к внешнему воздействию, что способствует необходимому отклику и обеспечивает высокий потенциал для производства целевых метаболитов и биопродуктов [6].

На сегодняшний день наблюдается несовершенство пищевых паттернов населения, приводящих к микронутриентной недостаточности, что является остро стоящей проблемой [7]. Дефицит микронутриентов играет важную роль в развитии алиментарно-зависимых состояний, которые, в свою очередь, могут способствовать возникновению различных заболеваний. Одним из таких заболеваний является сахарный диабет II-типа (СД2), который, по данным Федерального регистра, распространен среди ~ 4,6 млн человек в России [8]. СД 2 — патологическое состояние, при котором нарушена эффективность использования гормона углеводного обмена — инсулина. В условиях низкой производительности инсулина снижается проницаемость плазматических мембран для глюкозы, в связи с чем уровень сахара в биологических жидкостях повышается. Этому сопутствует рост осмотического давления, что приводит к обезвоживанию организма. На фоне этого состояния может возникнуть дефицит электролитов (Na, K, Ca, Mg). В свою очередь такой дисбаланс приводит к общей и мышечной слабости, к снижению функциональности крови и регенерации, а также к поражению глаз и к другим негативным последствиям [9]. Поддержанию нормального физиологического состояния организма и уменьшению риска прогрессирования СД 2 способствует употребление важных для синтеза и секреции инсулина микроэлементов [10]. Инсулин производят β-клетки островков Лангерганса, чувствительные к концентрации глюкозы в крови. В зрелых секреторных гранулах кроме инсулина находятся ионы Zn²⁺, которые отвечают за биосинтез и хранение гормона. Цинк не только входит в состав многих ферментов, но и участвует в процессах метаболизма, регуляции экспрессии генов и др. Дефицит цинка, наблюдаемый примерно у 1 млрд человек, может привести к развитию анемии, к нарушению иммунологической реактивности, к циррозу печени и к другим негативным последствиям [11,12]. Хром (Cr) — эссенциальный микроэлемент, который нормализует проницаемость клеточных мембран для глюкозы, управляет процессами использования и депонирования сахара клетками и увеличивает чувствительность рецепторов тканей к инсулину, а также отвечает за нормальное функционирование сердечно-сосудистой системы. Хром также благотворно влияет на организм при инфекционных процессах и в условиях окислительного стресса. Дефицит хрома может приводить к снижению толерантности к глюкозе и уровня ЛПВП, а также к повышению холестерина [13,14]. Таким образом, для микроэлементной профилактики прогрессирования СД 2 необходимо ежедневное потребление цинка (Zn) и хрома (Cr) в количестве (согласно МР 2.3.1.0253–21¹) 12 мг и 40 мкг соответственно.

Источниками биодоступного цинка являются продукты животного происхождения, такие как мясо (говядина, баранина, свинина, домашняя птица), рыба и морепродукты (устрицы), имеющие высокую стоимость [15]. Ценными источниками хрома могут служить также яйца, мясо, печень, сыр [16]. При этом стоит отметить ингибирующее влияние продуктов, в составе которых содержится фитин или фитиновая кислота, на усвоение цинка из таких источников, например, из пшеницы и из других злаковых культур [17,18].

Во многих работах отечественных и зарубежных исследователей отмечена более высокая биологическая доступность микроэлементов из микробиологических источников по сравнению с неорганическими формами, а также их экологическая чистота и способность снижать токсичность металлов. В работах [19–20] показана возможность получения органических форм селена (Se) с использованием микроорганизмов: селенометионин-обогащенные *Bifidobacterium bifidum*, а также селеноцистеин-обогащенные *Streptococcus thermophilus* и *Enterococcus faecium*. В исследовании [21] отмечено преимущество селенообогащенных дрожжей как натурального органического источника селенометионина, имеющего более высокую эффективность по сравнению с неорганическим селеном в терапии когнитивных нарушений у мышей. Рядом ученых описано успешное получение микроорганизмов, обогащенных органическими формами микроэлементов, путем культивирования дрожжей *Yarrowia lipolytica* на средах с добавлением неорганической соли Se (селенита) [22], а также бактерий *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactococcus lactis* на средах с добавлением хлорида магния [23]. По результатам отмечено, что полученные магнием-обогащенные бактерии были успешно применены в производстве фортифицированного мороженого. В работе [24] исследовали влияние биодоступности обогащенных хромом (Cr) дрожжей и хлорида хрома на показатели роста цыплят-бройлеров. Отмечена более высокая биодоступность хрома из органических источников по сравнению с неорганическими, а также улучшение показателей роста цыплят и характеристик тушек при использовании в рационах Cr-обогащенных дрожжей. В работах [25,26,27,28] рассматривали возможность применения различных родов бактерий (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*) в качестве объектов для обогащения микроэлементными: селеном (Na₂SeO₃), цинком (ZnO), марганцем (MnCl₂), медью (CuCl₂). Результаты данных работ подтверждают перспективность проведения исследований по фортификации микробной биомассы эссенциальными микроэлементами.

В ряде работ показано, что дрожжи являются перспективной системой для обогащения микроэлементными, т. к. содержат витамины, играющие регуляторную роль в метаболизме человека. К ним относится, например, рибофлавин, образующий с цинком более эффективное соединение [29,30], а также эргостерин — провитамин D₂ [31]. Дефицит витамина D, как известно, является глобальной проблемой, затрагивающей примерно 1 млрд человек, из которых чуть более 123 млн являются гражданами России [32–33]. Недостаток витамина D в рационе может приводить к нарушениям метаболизма кальция и фосфатов, что, в свою очередь, вызывает некорректную минерализацию костной ткани [34]. Также дефицит витамина D снижает иммунную защиту организма и несет риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [35].

Таким образом, биотехнологический способ получения пищевых ингредиентов на основе обогащенных микроэлементными микроорганизмов является актуальным и перспективным. Однако практически отсутствуют систематизированные данные о влиянии способов фортификации дрожжей на уровень встраивания микроэлементов, на их биодоступность, а также на технологические показатели обогащенных дрожжей при использовании их в хлебопечении.

Целью данной работы стало исследование возможности обогащения хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* эссенциальными микроэлементами (цинком и хромом).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Исследовать возможность обогащения хлебопекарных дрожжей микроэлементами (Zn и Cr) индивидуально и сочетано;
- 2) Исследовать возможность использования обогащенных дрожжей в производстве пищевых продуктов (на примере хлеба).

2. Объекты и методы

Объектом данного исследования стали дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae* из коллекции микроорганизмов ВНИИ пищевой биотехнологии. В качестве источников микроэлементов были выбраны неорганические соли, разрешенные ТР ТС 021/2011² для использования в пищевой промышленности, в том числе в производстве биологически активных добавок (БАД): сульфат цинка (ZnSO₄ × 5H₂O) и хлорид хрома (III) (CrCl₃ × 6H₂O).

Экспериментальные образцы обогащенных дрожжей получали периодическим способом культивирования в течение 18 ч. при 30 ± 2 °C, 200 RPM. Биофортификацию осуществляли путем внесения

¹ МР 2.3.1.0253–21 «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации» Москва: ЦЕНТРАМ, 2023. — 80 с.

² ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции», утв. решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880.

растворов солей в питательную среду. В качестве значимого фактора рассматривали дозировку микроэлемента.

Экспериментальные образцы хлебобулочных изделий были изготовлены из одной партии сырья, включающей муку пшеничную (ГОСТ Р 26574–2017³), сахар (ГОСТ 33222–2015⁴), не йодированную соль (ГОСТ Р 51574–2018⁵), сухое молоко (ГОСТ 33629–2015⁶), масло подсолнечное (ГОСТ 1129–2013⁷), а также на основе одного штамма дрожжей.

Содержание микроэлементов в дрожжах определяли методом атомно-адсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией на приборе Agilent 240Z (Agilent Technologies, США) по ГОСТ Р 57162–2016⁸.

Определение содержания сырого протеина в образцах дрожжей проводили по методу Кельдаля согласно ГОСТ Р 57221–2016⁹ на установке Vapodest (Gerhardt, Германия).

Аминокислотный состав образцов хлеба определяли методом ВЭЖХ согласно ГОСТ 32195–2013¹⁰ на хроматографе AZURA (Knauer, Германия). Детектирование осуществляли при $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 440$ нм (для пролина).

Для органолептической характеристики полученных образцов хлеба проводили оценку по 5-балльной шкале по следующим показателям: форма, поверхность, цвет, пропеченность, промес, пористость, вкус, запах. Определение кислотности и влажности проводили согласно ГОСТ 5670–96¹¹ и ГОСТ 21094–2022¹² соответственно.

В таблицах приведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения ($\bar{x} \pm SD$; $n = 3$). Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Исследование возможности обогащения хлебопекарных дрожжей микроэлементами (Zn и Cr) индивидуально и сочетанно

Основываясь на теоретических и практических данных о способности дрожжей аккумулировать минеральные вещества [36], изучали возможность получения обогащенных ингредиентов на их основе.

Первым этапом исследования стала фортификация дрожжей микроэлементами индивидуально. В качестве значимого фактора была выбрана дозировка Zn, в качестве соли-источника которого использовали сульфат цинка ($ZnSO_4 \times 5H_2O$). Полученный вариант должен был отличаться повышенным содержанием СП и показать накопление цинка дрожжами. Результаты фортификации хлебопекарных дрожжей сульфатом цинка приведены на Рисунке 1.

По результатам отмечено, что внесение сульфата цинка в дозировках 250 и 500 мг Zn/дм³ позволяет достичь статистически значимого ($p < 0,05$) увеличения содержания сырого протеина в фортифицированных дрожжах по сравнению с контролем, что соответствовало нашей гипотезе. При этом между вариантами обогащенных дрожжей отличия были незначительны, что дает возможность использовать меньшую дозировку соли микроэлемента для получения целевого ингредиента. Таким образом, оптимальной выбрали дозировку 250 мг Zn/дм³, вызывающую повышение содержания сырого протеина на $11,6 \pm 0,5\%$. Это позволяет получить дрожжи со степенью обогащения 82,1%, при которой концентрация микроэлемента составляет 683 ± 34 мг Zn на 100 г дрожжей. Полученные данные коррелируют с результатами Sheykhi et al. [36], которые установили, что накопление цинка в дрожжах увеличивается при повышении концентраций сульфата цинка в питательных средах.

³ ГОСТ 26574–2017 «Мука пшеничная хлебопекарная. Технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2018. — 21 с.

⁴ ГОСТ 33222–2015 «Сахар белый. Технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2019. — 22 с.

⁵ ГОСТ Р 51574–2018 «Соль пищевая. Общие технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2018. — 12 с.

⁶ ГОСТ 33629–2015 «Консервы молочные. Молоко сухое. Технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2017. — 13 с.

⁷ ГОСТ 1129–2013 «Масло подсолнечное. Технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2019. — 20 с.

⁸ ГОСТ Р 57162–2016 «Вода. Определение содержания элементов методом атомно-адсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией». — Москва: Стандартинформ, 2019. — 23 с.

⁹ ГОСТ Р 57221–2016 «Дрожжи кормовые. Методы испытаний». — Москва: Стандартинформ, 2020. — 57 с.

¹⁰ ГОСТ 32195–2013 «Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот». — Москва: Стандартинформ, 2020. — 23 с.

¹¹ ГОСТ 5670–96 «Хлебобулочные изделия. Методы определения кислотности». — Москва: Стандартинформ, 2006. — 9 с.

¹² ГОСТ 21094–2022 «Изделия хлебобулочные. Методы определения влажности». — Москва: Стандартинформ, 2022. — 17 с.

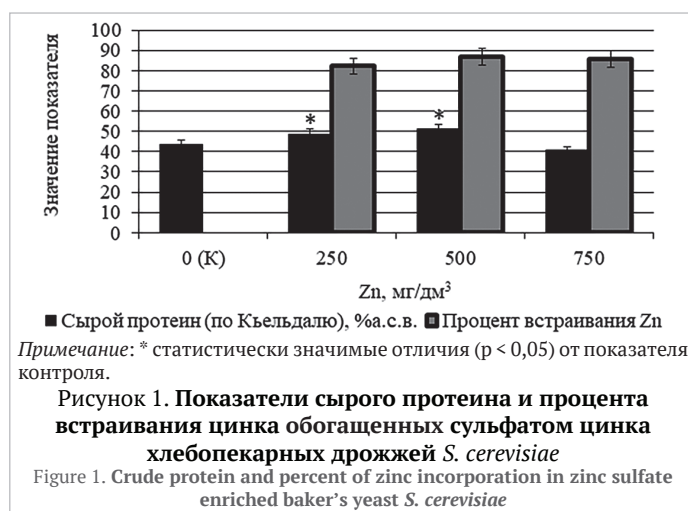


Рисунок 1. Показатели сырого протеина и процента встраивания цинка обогащенных сульфатом цинка хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae*

Figure 1. Crude protein and percent of zinc incorporation in zinc sulfate enriched baker's yeast *S. cerevisiae*

Далее, основываясь на результатах собственных исследований [37] и данных Zhang S. Q. et al. [38] о невысокой абсорбции неорганического и пищевого хрома и способности образования пептидными структурами дрожжевой клетки биоплексов с ионами Cr, изучали возможность получения обогащенных ингредиентов — источников биодоступного Cr. В данном эксперименте дозировка хрома варьировала в пределах от 100 до 1000 мкг/дм³, в качестве соли-источника использовали хлорид хрома (III) ($CrCl_3 \times 6H_2O$) [37]. Результаты фортификации дрожжей хлоридом хрома представлены на Рисунке 2.

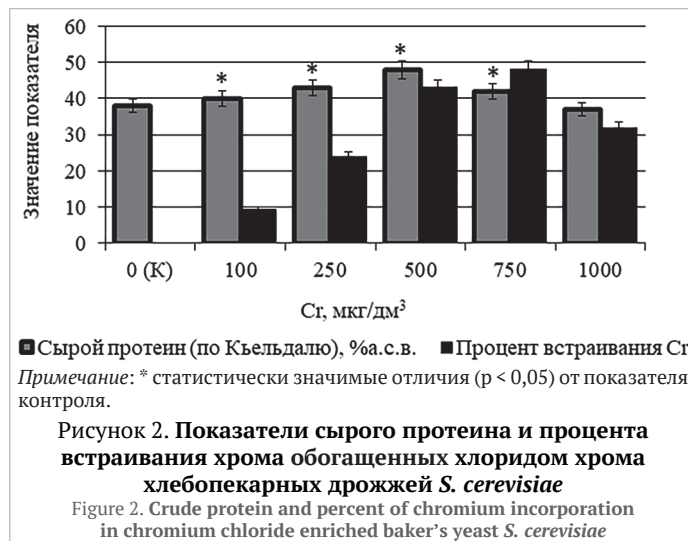


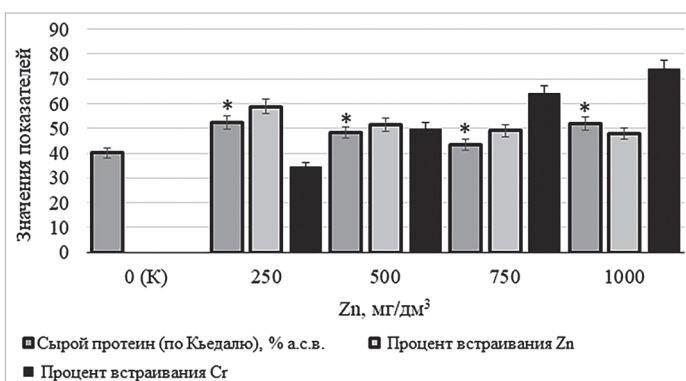
Рисунок 2. Показатели сырого протеина и процента встраивания хрома обогащенных хлоридом хрома хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae*

Figure 2. Crude protein and percent of chromium incorporation in chromium chloride enriched baker's yeast *S. cerevisiae*

По результатам отмечено, что внесение хлорида хрома в дозировках менее 1000 мкг Cr/дм³ позволяет достичь статистически значимого ($p < 0,05$) увеличения содержания сырого протеина в фортифицированных дрожжах по сравнению с контролем. Дозировка свыше 750 мкг Cr/дм³ вызвала ингибирование развития культуры, что соотносится с данными Lipinska E. et al. [39], в исследовании которых отмечается, что в высоких дозах хром может подавлять рост дрожжей. Среди вариантов обогащенных дрожжей также имелись значимые различия, при этом оптимальной оказалась дозировка 500 мкг Cr/дм³, вызывающая повышение содержания сырого протеина на $26 \pm 1,3\%$, при которой обогащение составило 43,1% — концентрация микроэлемента $512,5 \pm 25$ мкг Cr на 100 г дрожжей.

Полученные данные подтверждают возможность обогащения хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae* микроэлементами со статистически значимым улучшением технологических показателей. Положительный отклик культуры на обогащение дает возможность для проведения дальнейших исследований фортификации дрожжей сочетано с целью получения вариантов с накоплением одновременно цинка и хрома.

В ходе следующего эксперимента были рассмотрены различные дозировки цинка, при оптимальной дозировке хрома, равной 500 мкг Cr/дм³. Результаты фортификации дрожжей сочетано представлены на Рисунке 3.



Примечание: * статистически значимые отличия ($p < 0,05$) от показателя контроля.

Рисунок 3. Показатели сырого протеина и процента встраивания цинка и хрома обогащенных сульфатом цинка и хлоридом хрома хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae*

Figure 3. Crude protein and percent of zinc and chromium incorporation in baker's yeast *S. cerevisiae* enriched with zinc sulfate and chromium chloride

По результатам отмечено, что обогащение дрожжей цинком и хромом одновременно позволяет достичь значимого ($p < 0,05$) увеличения содержания сырого протеина по сравнению с контролем. Среди фортифицированных вариантов также отмечены значимые различия, при этом оптимальными были дозировки 250 мг Zn/дм³ и 500 мкг Cr/дм³, вызывающие повышение содержания сырого протеина на $30 \pm 1,5\%$. Это позволяет достичь обогащения цинком 58,8% и хромом 34,4%, концентрации микроэлементов достигали $263,4 \pm 13$ мг Zn/100 г дрожжей и $308,2 \pm 15$ мкг Cr/100 г дрожжей соответственно.

Полученные данные подтверждают возможность сочетанного обогащения хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae* со статистически значимым улучшением технологических показателей.

3.2. Исследование возможности использования обогащенных дрожжей в производстве пищевых продуктов (на примере хлеба)

Для подтверждения возможности применения полученных обогащенных хлебопекарных дрожжей в пищевой промышленности проводили наработку экспериментальной партии фортифицированных дрожжей с подобранными оптимальными дозировками микроэлементов. Затем были изготовлены образцы хлеба с полной заменой дрожжей, при этом не производилось обогащение в рецептуре контрольного образца. Результаты представлены на Рисунке 4.

Влажность и кислотность полученных образцов соответствовали требованиям ГОСТ Р 58233–2018¹⁵ и составляли 42,60% и 3,0 град. у контроля и 44,07% и 3,0 град. у опытного образца.

Проводили органолептическую оценку полученных образцов хлебобулочных изделий по восьми качественным показателям. Результаты представлены на Рисунке 5.

Как видно из профилограммы, при органолептической оценке были отмечены незначительные различия в показателях хлеба с внесением в рецептуру экспериментальных дрожжей по сравнению с контролем. Показано, что в основном эти различия касались таких показателей хлеба, как «форма», «поверхность» и «пористость».

¹⁵ГОСТ Р 58233–2018 «Хлеб из пшеничной муки. Технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2019. — 14 с.



Рисунок 5. Профилограмма экспериментальных образцов хлебобулочных изделий: контроль — с дрожжами, без обогащения; опыт — с дрожжами, обогащенными цинком и хромом

Figure 5. Profilogram of the experimental samples of bakery products: control — with yeast, without enrichment; experimental sample — with yeast enriched with zinc and chromium

Сопутствующей частью данного исследования было определение аминокислотного и элементного состава для подтверждения повышения пищевой ценности получаемого продукта. Поэтому далее был проведен аминокислотный анализ полученных экспериментальных образцов хлеба. Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотный состав белковых веществ образцов хлеба

Table 1. Amino acid composition of protein substances in bread samples

Аминокислота, мг/100 г	Хлеб Контроль	Хлеб Zn+Cr
Валин (Val)	325,02 ± 42,25	319,02 ± 41,47
Изолейцин (Ile)	304,35 ± 36,52	323,69 ± 38,84*
Лейцин (Leu)	597,65 ± 77,69	594,70 ± 77,31
Лизин (Lys)	98,58 ± 6,90	257,42 ± 18,02*
Метионин (Met)	111,15 ± 8,89	121,38 ± 9,71*
Треонин (Thr)	255,44 ± 30,65	234,18 ± 28,10*
Триптофан (Trp)	1356,72 ± 176,37	1870,98 ± 243,23*
Фенилаланин (Phe)	377,09 ± 26,40	380,93 ± 26,67
Незаменимые, всего	3426,03 ± 171,30	4102,3 ± 205,12*
Аспарагиновая кислота (Asp)	412,21 ± 32,98	384,59 ± 30,77*
Серин (Ser)	440,49 ± 39,64	401,78 ± 36,16*
Глутаминовая кислота (Glu)	3037,55 ± 212,63	2824,06 ± 197,68*
Пролин (Pro)	871,40 ± 61,00	908,30 ± 63,58
Глицин (Gly)	268,58 ± 18,80	262,91 ± 18,40
Аланин (Ala)	241,45 ± 16,90	246,75 ± 17,27
Тирозин (Tyr)	124,06 ± 14,89	128,35 ± 15,40
Гистидин (His)	80,86 ± 6,47	256,99 ± 20,56*
Аргинин (Arg)	126,16 ± 8,83	295,97 ± 20,72*
Заменимые, всего	5602,77 ± 280,13	5709,70 ± 285,49
Всего:	9028,77 ± 496,58	9812,01 ± 539,66*
Незаменимые: Заменимые	1: 1,63	1: 1,39

Примечание: * статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от показателя хлеба с дрожжами без обогащения.



Рисунок 4. Экспериментальные образцы хлебобулочных изделий: (А) — контроль с дрожжами без обогащения; (В) — опыт с дрожжами, обогащенными цинком и хромом

Figure 4. Experimental samples of bakery products: (A) — control with yeast without enrichment; (B) — experiment with yeast enriched with zinc and chromium

Отмечено, что в опытных образцах хлеба содержалось достоверно большее количество незаменимых аминокислот (в 1,2 раза), чем у контрольных образцов, полученных в аналогичных условиях.

Далее определяли содержание исследуемых микроэлементов в образцах хлеба с обогащенными дрожжами для выявления возможности обеспечения профилактики микронутриентной недостаточности. Расчет количества необходимых веществ для восполнения рекомендуемой суточной нормы физиологической потребности (РСНП) в цинке и хrome согласно МР 2.3.1.0253–21 приведен в Таблице 2.

Таблица 2. Расчетное значение восполнения рекомендуемой суточной нормы физиологической потребности согласно МР 2.3.1.0253–21 при употреблении хлеба с добавлением обогащенных ингредиентов

Table 2. Calculated value of replenishment of the recommended daily physiological requirement according to MR2.3.1.0253–21 when eating bread with the addition of enriched ingredients

Наименование микроэлемента	РСНП	Верхний допустимый уровень потребления	Хлеб Zn + Cr, 100 г
Цинк (Zn)	12 мг/сут.	25 мг/сут.	68,5 ± 3,4%
Хром (Cr)	50 мкг/сут.	250 мкг/сут.	19,2 ± 1,0%

Как видно из Таблицы 2, необходимо употребление не более 100 г опытного образца хлеба для восполнения более 15% от РСНП, что подтверждает возможность использования обогащенных дрожжей для получения пищевых продуктов, одним из направлений применения которых будет являться профилактика микронутриентной недостаточности.

4. Выводы

Таким образом, экспериментально доказана возможность получения обогащенных цинком и хромом хлебопекарных дрожжей с улучшенными технологическими показателями для внесения их в состав продуктов питания на примере хлебобулочных изделий. Обогащенные пищевые продукты с применением данных образцов могут быть использованы для профилактики микронутриентной недостаточности. Так как данная форма «обогащенных микроэлементными хлебопекарных дрожжей» не входит в перечень разрешенных к применению в пищевом производстве согласно ТР ТС 021/2011, необходимо проведение дальнейших исследований их биобезопасности. После прохождения всех контрольных испытаний данные ингредиенты будут представлять собой перспективный источник микронутриентов для производителей и потребителей.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Тутельян, В. А., Шарафетдинов, Х. Х., Лапик, И. А., Воробьева, И. С., Суханов, Б. П. (2014). Приоритеты в разработке специализированных пищевых продуктов оптимизированного состава для больных сахарным диабетом 2 типа. *Вопросы питания*, 83(6), 41–51.
- Серб, Е. М., Юраскина, Т. В., Римарева, Л. В., Ревякина, В. А., Медриш, М. Э., Погорельская, Н. С. (2022). Ферментализат *Saccharomyces cerevisiae*: научно-практическое обоснование использования в качестве биологически активной добавки. *Биотехнология*, 38(4), 107–113. <https://doi.org/10.56304/S0234275822040123>
- Мазо, В. К., Зорин, С. П. (2008). Перспективы биотехнологического получения новых пищевых источников органических соединений селена. *Успехи современного естествознания*, 11, Статья 15.
- Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M. (2021). Yeast interactions and molecular mechanisms in wine fermentation: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), Article 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>
- Nielsen, J. (2019). Yeast systems biology: Model organism and cell factory. *Biotechnology Journal*, 14(9), Article e1800421. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
- Jordá, T., Puig, S. (2020). Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(7), Article 795. <https://doi.org/10.3390/genes11070795>
- Al-Fartusie, F. S., Mohsan, S. N. (2017). Essential trace elements and their vital roles in human body. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, 5(3), 127–136.
- Дедов, И. И., Шестакова, М. В., Вихолова, О. К., Железнякова, А. В., Исаков, М. А., Сазонова, Д. В. и др. (2023). Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010–2022 гг. *Сахарный диабет*, 26(2), 104–123. <https://doi.org/10.14341/DM13035>
- Waleed, A., Ahmed, A. A. (2022). Disturbance of Electrolytes (Na, K and Cl) Homeostasis among Patients with Type II Diabetes Mellitus. *Libyan Journal of Medical Research*, 16(2), 153–160.
- Dubey, P., Thakur, V., Chattopadhyay, M. (2020). Role of minerals and trace elements in diabetes and insulin resistance. *Nutrients*, 12(6), Article 1864. <https://doi.org/10.3390/nu12061864>
- Шейбак, В. М. (2015). Синтез и секреция инсулина: роль катионов цинка. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 1(49), 5–8.
- Prasad, A. S. (2017). Discovery of zinc for human health and biomarkers of zinc deficiency. Chapter in a book: *Molecular, genetic, and nutritional aspects of major and trace minerals*. Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals. Academic Press, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00020-8>
- Khodavirdipour, A., Haddadi, F., Keshavarzi, S. (2020). Chromium supplementation negotiation with diabetes mellitus, hyperlipidemia and depression. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 19(1), 585–595. <https://doi.org/10.1007%2Fs40200-020-00501-8>
- Swaroop, A., Bagchi, M., Preuss, H. G., Zafra-Stone, S., Ahmad, T., Bagchi, D. (2019). Benefits of chromium (III) complexes in animal and human health. Chapter in a book: *The nutritional biochemistry of chromium (III)*. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64121-2.00008-8>
- Bohrer, B. M. (2017). Review: Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. *Trends in Food Science and Technology*, 65, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.016>
- Gharibzadeh, S. M. T., Jafari, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nano-encapsulation. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017>
- Handa, V., Sharma, D., Kaur, A., Arya, S. K. (2020). Biotechnological applications of microbial phytase and phytic acid in food and feed industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, Article 101600. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101600>
- Gibson, R. S., Raboy, V., King, J. C. (2018). Implications of phytate in plant-based foods for iron and zinc bioavailability, setting dietary requirements, and formulating programs and policies. *Nutrition Reviews*, 76(11), 793–804. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy028>
- Krausova, G., Kana, A., Vecka, M., Hyrslova, I., Stankova, B., Kantorova, V. et al. (2021). In vivo bioavailability of selenium in selenium-enriched *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium* in CD IGS rats. *Antioxidants*, 10(3), Article 463. <https://doi.org/10.3390/antiox10030463>
- Jin, W., Yoon, C., Johnston, T. V., Ku, S., Ji, G. E. (2018). Production of selenomethionine — enriched *Bifidobacterium bifidum* BGN4 via sodium selenite biocatalysis. *Molecules*, 23(11), Article 2860. <https://doi.org/10.3390/molecules23112860>
- Zhang, Z.-H., Wu, Q.-Y., Chen, C., Zheng, R., Chen, Y., Ni, J.-Z. et al. (2018). Comparison of the effects of selenomethionine and selenium — enriched yeast in the triple — transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Food and Function*, 9(7), 3965–3973. <https://doi.org/10.1039/C7FO02063E>
- Kieliszek, M., Dourou, M. (2021). Effect of selenium on the growth and lipid accumulation of *Yarrowia lipolytica* yeast. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1611–1622. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02266-w>
- Góral, M., Kozłowiec, K., Pankiewicz, U., Góral, D. (2018). Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food Chemistry*, 239, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.053>
- Król, B., Stupczyńska, M., Kinal, S., Bodarski, R., Tronina, W., Mońka, M. (2017). Bioavailability of organic and inorganic sources of chromium in broiler chicken feeds. *Journal of Elementology*, 22(1), 283–294. <https://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.1.1119>
- Yang, J., Wang, J., Yang, K., Liu, M., Qi, Y., Zhang, T. et al. (2018). Antibacterial activity of selenium — enriched lactic acid bacteria against common food — borne pathogens *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 1930–1942. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13430>
- Pieniz, S., Andreazza, R., Mann, M.B., Camargo, F., Brandelli, A. (2017). Bioaccumulation and distribution of selenium in *Enterococcus durans*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.12.003>
- Pophaly, S. D., Poonam, Singh, P., Kumar, H., Tomar, S.K., Singh, R. (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 39(2), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.006>
- Adiwena, M., Murtillaksono, A., Egra, S., Hoesain, M., Asyiah I. N., Pradana, A. P. et al. (2023). The effects of micronutrient-enriched media on the efficacy of *Bacillus subtilis* as biological control agent against *Meloidogyne incognita*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(1), 33–39. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240105>
- Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., Tekutyeva, L. A. (2020). Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: An overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, Article 570828. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>
- Rai, A. K., Pandey, A., Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.016>
- Liu, J.-F., Xia, J.-J., Nie, K.-L., Wang, F., Deng, L. (2019). Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, Article 98. <https://doi.org/10.1007/s1274-019-2673-2>
- Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M., Neuwersch-Sommeregger, S., Köstemberger, M., Berisha, A.T. et al. (2020). Vitamin D deficiency 2.0: An update on the current status worldwide. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(11), 1498–1513. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0558-y>
- Петрушкина А. А., Пигарова Е. А., Рожинская Л. Я. (2018). Эпидемиология дефицита витамина D в Российской Федерации. *Остеопороз и остеопатия*, 21(3), 15–20. <https://doi.org/10.14341/osteo10038>

34. Berger, M. M., Pantet, O., Schneider, A., Ben-Hamouda, N. (2019). Micronutrient deficiencies in medical and surgical inpatients. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), Article 931. <https://doi.org/10.3390/jcm8070931>
35. de la Guía-Galipienso, F., Martínez-Ferran, M., Vallecillo, N., Lavie, C. J., Sanchis-Gomar, F., Pareja-Galeano, H. (2021). Vitamin D and cardiovascular health. *Clinical Nutrition*, 40(5), 2946–2957. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.12.025>
36. Sheykhi F. et al. (2018). The effect of different concentrations of organic and inorganic zinc on the growth and zinc content in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biological Journal of Microorganism*, 7(28), 103–109. <https://doi.org/10.22108/BJM.2018.107135.1090>
37. Серб, Е. М., Соколова, Е. Н., Римарева, Л. В., Фурсова, Н. А., Волкова, Г. С., Курбатова, Е. И. и др. (2020). Перспективные расы хлебопекарных дрожжей для получения пищевых ингредиентов, обогащенных селеном и хромом. *Вопросы питания*, 89(6), 48–57. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10078>
38. Zhang, S.-Q., Qin, X.-W., Zhang, Y. (2023). Pharmacokinetics of chromium-enriched yeast in rats following oral administration. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(1), 167–170. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02334-z>
39. Lipinska, E., Błażej, S., Koczoń, P., Piwowarek, K. (2019). Research on the quality of baker's yeast enriched with chromium. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 596, 13–21. <https://doi.org/10.22630/zppnr.2019.596.2>

REFERENCES

1. Tutelyan, V. A., Sharafetdinov, Kh. Kh., Lapik, I. A., Vorobyeva, I. S., Sukhanov, B. P. (2014). Priorities in the development of specialized food products with optimized composition for patients with type 2 diabetes mellitus. *Problems of Nutrition*, 83(6), 41–51. (In Russian)
2. Serba, E. M., Yuraskina, T. V., Rimareva, L. V., Revyakina, V. A., Medrish, M. E., Pogorzelskaya, N. S. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* enzymatic hydrolysis: scientific and practical substantiation of its use as a biologically active supplement. *Biotechnologiya*, 38(4), 107–113. <https://doi.org/10.56304/S0234275822040123> (In Russian)
3. Mazo, V. K., Zorin, S. P. (2008). Prospects for the biotechnological production of new food sources of organic selenium compounds. *Advances in Current Natural Sciences*, 11, Article 15. (In Russian)
4. Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M. (2021). Yeast interactions and molecular mechanisms in wine fermentation: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), Article 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>
5. Nielsen, J. (2019). Yeast systems biology: Model organism and cell factory. *Biotechnology Journal*, 14(9), Article e1800421. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
6. Jordá, T., Puig, S. (2020). Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(7), Article 795. <https://doi.org/10.3390/genes11070795>
7. Al-Fartusie, F. S., Mohssan, S. N. (2017). Essential trace elements and their vital roles in human body. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, 5(3), 127–136.
8. Dedov, I. I., Shestakova, M. V., Vikulova, O. K., Zheleznyakova, A. V., Isakov, M. A., Sazonova, D. V. et al. (2023) Diabetes mellitus in the Russian Federation: Dynamics of epidemiological indicators according to the Federal Register of diabetes mellitus for the period 2010–2022. *Diabetes Mellitus*, 26(2), 104–123. <https://doi.org/10.14341/DM13035> (In Russian)
9. Waled, A., Ahmed, A. A. (2022). Disturbance of Electrolytes (Na, K and Cl). Homeostasis among Patients with Type II Diabetes Mellitus. *Libyan Journal of Medical Research*, 16(2), 153–160.
10. Dubey, P., Thakur, V., Chattopadhyay, M. (2020). Role of minerals and trace elements in diabetes and insulin resistance. *Nutrients*, 12(6), Article 1864. <https://doi.org/10.3390/nu12061864>
11. Sheybak, V. M. (2015). Synthesis and secretion of insulin: Role of zinc cations. *Journal of the Grodno State Medical University*, 1(49), 5–8. (In Russian)
12. Prasad, A. S. (2017). Discovery of zinc for human health and biomarkers of zinc deficiency. Chapter in a book: *Molecular, genetic, and nutritional aspects of major and trace minerals. Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*. Academic Press, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00020-8>
13. Khodavirdipour, A., Haddadi, F., Keshavarzi, S. (2020). Chromium supplementation negotiation with diabetes mellitus, hyperlipidemia and depression. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 19(1), 585–595. <https://doi.org/10.1007/s1340200-020-00501-8>
14. Swaroop, A., Bagchi, M., Preuss, H. G., Zafra-Stone, S., Ahmad, T., Bagchi, D. (2019). Benefits of chromium (III) complexes in animal and human health. Chapter in a book: *The nutritional biochemistry of chromium (III)*. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64121-2.00008-8>
15. Bohrer, B. M. (2017). Review: Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. *Trends in Food Science and Technology*, 65, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.016>
16. Gharibzadeh, S. M. T., Jafari, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nano-encapsulation. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.017>
17. Handa, V., Sharma, D., Kaur, A., Arya, S. K. (2020). Biotechnological applications of microbial phytase and phytic acid in food and feed industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, Article 101600. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101600>
18. Gibson, R. S., Raboy, V., King, J. C. (2018). Implications of phytate in plant-based foods for iron and zinc bioavailability, setting dietary requirements, and formulating programs and policies. *Nutrition Reviews*, 76(11), 793–804. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy028>
19. Krausova, G., Kana, A., Vecka, M., Hyrslova, I., Stankova, B., Kantorova, V. et al. (2021). In vivo bioavailability of selenium in selenium-enriched *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium* in CD IGS rats. *Antioxidants*, 10(3), Article 463. <https://doi.org/10.3390/antiox10030463>
20. Jin, W., Yoon, C., Johnston, T. V., Ku, S., Ji, G. E. (2018). Production of selenomethionine — enriched *Bifidobacterium bifidum* BGN4 via sodium selenite biocatalysis. *Molecules*, 23(11), Article 2860. <https://doi.org/10.3390/molecules23112860>
21. Zhang, Z.-H., Wu, Q.-Y., Chen, C., Zheng, R., Chen, Y., Ni, J.-Z. et al. (2018). Comparison of the effects of selenomethionine and selenium — enriched yeast in the triple — transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Food and Function*, 9(7), 3965–3973. <https://doi.org/10.1039/C7FO02063E>
22. Kieliszek, M., Dourou, M. (2021). Effect of selenium on the growth and lipid accumulation of *Yarrowia lipolytica* yeast. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1611–1622. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02266-w>
23. Góral, M., Kozłowiec, K., Pankiewicz, U., Góral, D. (2018). Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food Chemistry*, 239, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.053>
24. Król, B., Słupczyńska, M., Kinal, S., Bodarski, R., Tronina, W., Mořka, M. (2017). Bioavailability of organic and inorganic sources of chromium in broiler chicken feeds. *Journal of Elementology*, 22(1), 283–294. <https://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.1.1119>
25. Yang, J., Wang, J., Yang, K., Liu, M., Qi, Y., Zhang, T. et al. (2018). Antibacterial activity of selenium — enriched lactic acid bacteria against common food — borne pathogens *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 1930–1942. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13430>
26. Pieniz, S., Andrazza, R., Mann, M. B., Camargo, F., Brandelli, A. (2017). Bioaccumulation and distribution of selenium in *Enterococcus durans*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.12.003>
27. Pophaly, S. D., Poonam, Singh, P., Kumar, H., Tomar, S. K., Singh, R. (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 39(2), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.006>
28. Adiwena, M., Murtiaksano, A., Egra, S., Hoesain, M., Asyiah I. N., Pradana, A. P. et al. (2023). The effects of micronutrient-enriched media on the efficacy of *Bacillus subtilis* as biological control agent against *Meloidogyne incognita*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(1), 33–39. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240105>
29. Averianova, L. A., Balabanova, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., Tekutyeva, L. A. (2020). Production of vitamin B2 (riboflavin) by microorganisms: An overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, Article 570828. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>
30. Rai, A. K., Pandey, A., Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.016>
31. Liu, J.-F., Xia, J.-J., Nie, K.-L., Wang, F., Deng, L. (2019). Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, Article 98. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2673-2>
32. Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M., Neuwersch-Sommeregger, S., Köstnerberger, M., Berisha, A. T. et al. (2020). Vitamin D deficiency 2.0: An update on the current status worldwide. *European Journal of Clinical Nutrition*, 74(11), 1498–1513. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0558-y>
33. Petrushkina, A. A., Pigarova, E. A., Rozhinskaya, L. Ya. (2018). The prevalence of vitamin D deficiency in Russian Federation. *Osteoporosis and Bone Diseases*, 21(3), 15–20. <https://doi.org/10.14341/osteo10038> (In Russian)
34. Berger, M. M., Pantet, O., Schneider, A., Ben-Hamouda, N. (2019). Micronutrient deficiencies in medical and surgical inpatients. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7), Article 931. <https://doi.org/10.3390/jcm8070931>
35. de la Guía-Galipienso, F., Martínez-Ferran, M., Vallecillo, N., Lavie, C. J., Sanchis-Gomar, F., Pareja-Galeano, H. (2021). Vitamin D and cardiovascular health. *Clinical Nutrition*, 40(5), 2946–2957. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.12.025>
36. Sheykhi F. et al. (2018). The effect of different concentrations of organic and inorganic zinc on the growth and zinc content in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biological Journal of Microorganism*, 7(28), 103–109. <https://doi.org/10.22108/BJM.2018.107135.1090>
37. Serba, E. M., Sokolova, E. N., Rimareva, L. V., Fursova, N. A., Volkova, G. S., Kurbatova, E. I. et al. (2020). Promising races of baker's yeast for the production of food ingredients enriched with selenium and chromium. *Problems of Nutrition*, 89(6), 48–57. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10078> (In Russian)
38. Zhang, S.-Q., Qin, X.-W., Zhang, Y. (2023). Pharmacokinetics of chromium-enriched yeast in rats following oral administration. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(1), 167–170. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02334-z>
39. Lipinska, E., Błażej, S., Koczoń, P., Piwowarek, K. (2019). Research on the quality of baker's yeast enriched with chromium. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 596, 13–21. <https://doi.org/10.22630/zppnr.2019.596.2>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Юраскина Татьяна Владимировна — аспирант, младший научный сотрудник, отдел биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и БАД, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» 111033, Москва, Самокатная ул., 4Б Тел.: +7-495-362-45-72 E-mail: tatyana.vlad.yuraskina@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6877-9933 * автор для контактов	Tatyana V. Yuraskina, Postgraduate Student, Junior Researcher, Department of Biotechnology of Enzymes, Yeasts, Organic Acids and Dietary Supplements, Russian Research Institute of Food Biotechnology is a Branch of Federal State Budget Institution of science "Federal Research Center of Food, Biotechnology and Food Safety" 4B, Samokatnaya str., 111033, Moscow, Russia Tel.: +7-495-362-45-72 E-mail: tatyana.vlad.yuraskina@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6877-9933 * corresponding author
Соколова Елена Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, отдел биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и БАД, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» 111033, Москва, Самокатная ул., 4Б Тел.: +7-495-362-45-72 E-mail: elenani.sokolova@inbox.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6084-7786	Elena N. Sokolova, Candidate of Sciences in Biology, Leading Researcher, Department of Biotechnology of Enzymes, Yeasts, Organic Acids and Dietary Supplements, Russian Research Institute of Food Biotechnology is a Branch of Federal State Budget Institution of science "Federal Research Center of Food, Biotechnology and Food Safety" Tel.: +7-495-362-45-72 E-mail: elenani.sokolova@inbox.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6084-7786
Фурсова Наталья Александровна — заведующий лабораторией биотехнологии пекарных дрожжей, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» 111033, Москва, Самокатная ул., 4Б Тел.: +7-495-362-36-31 E-mail: pekardroj@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3903-6644	Natalya A. Fursova — Head of the Laboratory of Baker's Yeast Biotechnology, Russian Research Institute of Food Biotechnology is a Branch of Federal State Budget Institution of science "Federal Research Center of Food, Biotechnology and Food Safety" 4B, Samokatnaya str., 111033, Moscow, Russia Tel.: +7-495-362-36-31 E-mail: pekardroj@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3903-6644
Серба Елена Михайловна — доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН, Заместитель директора по научной работе, Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» 111033, Москва, Самокатная ул., 4-Б Тел.: +7-916-515-92-73 E-mail: serbae@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1660-2634	Elena M. Serba, Doctor of Biological Sciences, Docent, Professor of the Russian Academy of Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research, Russian Research Institute of Food Biotechnology is a Branch of Federal State Budget Institution of science "Federal Research Center of Food, Biotechnology and Food Safety" 4-B, Samokatnaya str., 111033, Moscow, Russia Tel.: +7-916-515-92-73 E-mail: serbae@mail.ru ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1660-2634
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.