

Научные и практические аспекты создания натуральных безалкогольных ферментированных напитков функциональной направленности

Е.А.Цед*, З.В. Василенко

Могилевский государственный университет продовольствия

пр. Шмидта, д.3, Могилев, 212027, Беларусь

Тел. +375297442244, эл.почта tsedelena@inbox.ru

(Получено в январе 2019 г.; отдано в печать в апреле 2019 г.; доступ в интернете с 10 мая 2019 г.)

Аннотация

В статье приведены концептуальные основы создания продуктов питания функционального назначения и результаты работы по созданию научно-практических основ использования микроорганизмов природного консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ в бродильных производствах и разработке на его основе новой биотехнологии натуральных безалкогольных ферментированных напитков с функциональными и стимулирующими свойствами. Впервые представлены данные о биохимическом составе напитка, полученного с использованием консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ, и его влиянии на живой организм.

Ключевые слова: природные консорциумы, биотехнология натуральных ферментированных безалкогольных напитков, антибиотическая активность, доклиническая оценка..

Abstract

The article presents the conceptual foundations for the development of functional food products as well as the results of the work on creating scientific and practical bases for the use of microorganisms of the natural consortium *Oryzomyces indicis* RGC in fermentation industries and developing on its basis a new biotechnology of natural non-alcoholic fermented beverages with functional and stimulating properties. Data on the biochemical composition of the beverage obtained using the consortium *Oryzomyces indicis* RGC and on the influence it on a living organism are presented for the first time.

Key words: Natural consortium, biotechnology of natural fermented non-alcoholic beverages, antibiotic activity, pre-clinical assessment

Введение

Общепризнано, что нарушение структуры питания человека является главнейшим фактором, наносящим непоправимый урон здоровью человека, причем в ряде случаев, по мнению ряда ученых, на несколько порядков более сильный, чем даже экологическая загрязненность (Тутельян, 2007, Шендеров, 2003, Цыганков, 2008). В связи с этим, одним из основных направлений в области современного здорового питания является создание и производство функциональных пищевых продуктов (ФПП), способных регулировать физиологические процессы в организме человека, усиливать его защитные силы, предупреждать определенные заболевания, замедлять процессы старения и др. (Зуев, 2004, Малышев, 2012).

Концепция функциональных продуктов была разработана в конце 80-х годов прошлого столетия в Японии, согласно которой был принят закон о производстве продуктов функционального питания. Было определено, что «продукты функционального питания – это пищевые продукты природного происхождения, входящие в повседневный рацион и оказывающие определенное влияние на физическое и психическое состояние организма» (Дурнев, 2007, Кожевникова, 2012). Следует отметить, что около 25% мирового объема производства продуктов функционального питания приходится на долю Японии, около 40% – на долю США, около 35% – на долю стран ЕС, среди которых лидерами являются Германия, Франция и Великобритания. Республика Беларусь относится к числу европейских стран с низким объемом производства продуктов функционального питания.

До сих пор не существует всеобъемлющего и общепризнанного термина «функциональный продукт» (ФП). В работе (Kwak, 2001) под ФП понимаются продукты,

которые, обладая питательной ценностью, включают компоненты, обеспечивающие медицинское или физиологически положительное влияние. Есть мнение (Marriott, 2000), что ФП – это продукты, благоприятные для здоровья, помимо того, влияние, которое оказывают содержащиеся в них пищевые вещества; согласно трактовке (Grajek, 2005) «функциональные продукты включают в себя бактерии, растительные и животные продукты, содержащие физиологически активные вещества, полезные для здоровья и снижающие риск развития хронических болезней»; институтом питания Российской академии медицинских наук предложено новое определение ФП: «функциональный продукт – это продукт с измененным химическим составом, который с позиции доказательной медицины влияет на одну или несколько физиологических функций организма человека» и разделение ФП на 14 групп в зависимости от оказываемого воздействия на организм, например, для улучшения зрения, нормализации деятельности желудочно-кишечного тракта, нормализации гомеостаза и т.д. (Тихомирова, 2013).

В работе (Roberfroid, 2002) к функциональным продуктам питания относятся: а) продукты питания, содержащие требуемые количества физиологических ингредиентов (ФИ) естественного происхождения; б) натуральные продукты питания, с дополнительно внесенным ФИ; в) натуральные продукты питания, в которых отсутствуют вещества, препятствующие проявлению свойств ФИ; г) натуральные продукты питания с модифицированными физиологически активными ФИ д) натуральные продукты питания с модифицированными с высокой биоусвояемостью ФИ; е) натуральные или искусственные продукты питания, которые после применения технологических приемов, приобретают способность улучшать здоровье человека и снижать риск возникновения заболеваний.

Осуществлена попытка разграничить понятие «функциональные» и «традиционные» продукты по потребительским свойствам. Потребительские свойства ФП включают в себя три фактора – пищевую ценность, вкусовые свойства и физиологическое воздействие, а традиционные продукты характеризуются только первыми двумя факторами. Исходя из этого, Marriott В. и др. принципиально подчеркивают, что «под ФП следует понимать именно модифицированные продукты питания, которые получены с использованием специальных технологических приемов». Одним из таких приемов является понижение содержания вредных для здоровья компонентов, что может достигаться исключением из состава продуктов не физиологичных для организма человека веществ, примерами которых являются пищевые добавки с ксенобиотиками. Вторым технологическим приемом получения модифицированных продуктов с функциональными свойствами служит обогащение продукта функциональными ингредиентами (Рябиченко, 2016).

Таким образом, целью наших исследований являлось уточнение концептуальных подходов к понятию «функциональный продукт» и определение способности существующих современных технологий обеспечивать заявленные функциональные свойства получаемого пищевого продукта. Это явилось основанием для развития научно-практических основ нового направления в биотехнологиях безалкогольных и алкогольных продуктов брожения, позволяющих обеспечивать получение продуктов питания с биологически ценными и функциональными свойствами.

Методы исследований

Объектами исследования являлись: задепонированный в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси, природный консорциум микроорганизмов – *Oryzomyces indicis* РГЦ БИМ γВ-220Д, а также выделенные из его состава чистые культуры микроорганизмов-ассоциантов – молочнокислые бактерии *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* СК БИМ В-701 Д, дрожжи *Zygosaccharomyces fermentati* Naganishi расы CD БИМ Υ-225 Д.

При выполнении исследований были использованы общепринятые и специальные методы исследования – микробиологические, физико-химические, биохимические, биологические и молекулярно-генетические. В частности, пробоподготовку осуществляли по ГОСТ 6687.0 и по ГОСТ 31904. В готовых напитках массовую долю сухих и редуцирующих веществ определяли по ГОСТ 6687.2, концентрацию этилового спирта и летучие ароматические вещества – дистилляционным методом по ГОСТ 6687.7, титруемую и активную кислотность – по ГОСТ 6687.4. Содержание низкомолекулярных органических кислот – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии («*Agilent 1200*» (Германия)) по ГОСТ 32771, концентрацию свободных аминокислот – методом ВЭЖХ на хроматографе «Hewlett Packard» (Германия) (МВИ МН 1363-2000). Содержание высокомолекулярных жирных кислот устанавливали методом ионообменной жидкостно-колоночной хроматографии на хроматографе HRGC 5300 (Италия). Липиды экстрагировали по методу Bligh и Dyer. Содержание витаминов В₁ и В₂ – по ГОСТ 25999; витамин С – по ГОСТ 24556, ГОСТ 31643; витамин А (ретинол) – по ГОСТ 30627.1; витамин Е (токоферол) – по ГОСТ 30627.3; витамин РР (ниацин) – по ГОСТ 30627.4; фолиевую кислоту – флуориметрическим методом; содержание пантотеновой кислоты – газохроматографическим методом с использованием газового хроматографа «Цвет-500» (РФ) с пламенно-ионизационным детектором; витамин Р (танино-катехиновый комплекс) – методом Левенталя.

Антибиотическую активность ферментируемой консорциумом *Oryzomyces indicis* РГЦ питательной среды определяли в институте микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины с использованием диффузионного метода, основанного на диффузии антибиотического вещества, продуцируемого исследуемым микроорганизмом, в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру, и подавлении роста последней. В качестве тест-культур были использованы штаммы условно патогенных микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027), *Proteus vulgaris* УКМ В-905 (ATCC 6896), *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922 (F-50)), *Bacillus cereus* УКМ В-908 (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* УКМ В-904 (ATCC 25923 (F-49)), *Klebsiella pneumoniae* УКМ В-920 (ATCC 10031), *Salmonella enterica* УКМ В-921 (NCTC 6017). Оценку антагонистической активности проводили путем измерения диаметра зоны задержки роста (зон лизиса) вышеуказанных тест-культур. Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методам с использованием пакетов компьютерной программы «Statistika 7.0» (Stat Soft, Inc. США). Результат выражали как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий значения зон задержки роста проводили Post-hoc-тест с использованием LSD (наименьшее существующее различие, разновидность t-теста), который позволяет сравнивать все возможные пары средних, более чем двух выборок. Отличия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Доклинические исследования свойств напитка «Рисовит» проводили в ГУ НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси». Исследования проводили на экспериментальных животных: крысах линии Wistar (самцы 2-месячного возраста) и мышах линии ICR (самцы 2-месячного возраста), содержащихся в стандартных условиях лабораторного вивария экспериментально-биологической клиники ИФБ НАН Беларуси. Перед началом исследований животных выдерживали в карантинных условиях в течение двух недель. Молекулярно-клеточные характеристики клеток крови, костного мозга, тимуса, селезенки, печени, мышц, семенников определяли по оценке ploидности ДНК-методом проточной цитометрии на «Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA)» и оценивали содержание апоптотических клеток и степень их пролиферации на разных стадиях клеточного цикла. Проточная цитометрия – это флуоресцентный метод, используемый для измерения интенсивности флуоресценции микроскопических частиц и их сортировки. Сущность метода заключается в суспензировании частиц (например, клеток и хромосом),

окраске их флуоресцентным красителем с последующим пропусканием через лазерный луч. В одной пробе анализировали не менее 30 000 клеточных ядер.

Процент апоптотических клеток рассчитывали на основании измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной йодистым пропидием (250 мкг/мл, фирмы «Sigma»).

Онкопротекторные свойства напитка «Рисовит» оценивали по частоте аденом в легких мышей (напиток вводили животным внутрижелудочно в течение 30 дней). Исследования проводили на мышах (самцах 2-месячного возраста) линии ISR. Во всех группах (1 – уретан; 2 – рисовый гриб+уретан; 3 – рисовый гриб), кроме интактного контроля (4 группа), мышам внутрибрюшинно вводили уретан в дозе 1,5 мг/г веса. Количество опухолей в легких и частоту опухолеобразования (в процентах) определяли в пересчете на 1 мыш. Статистическую обработку результатов исследования и формирование базы данных с результатами исследований проводили с использованием программы MS Excel. Для определения достоверности измерений использовали t-критерий Стьюдента (с учетом дисперсии). Данные были подвергнуты проверке на нормальность распределения согласно тесту Шапиро-Уилка. Статистическую оценку полученных результатов проводили с использованием программ Statistica 7.0 и OriginPro 9.0. Для непараметрических выборок использовали критерий Манна-Уитни. Значения исследуемых показателей были представлены в виде среднего арифметического значения M и ошибки среднего m . Статистически значимыми считали различия при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно нормативным документам Республики Беларусь под функциональным пищевым продуктом (ФПП) понимают такой пищевой продукт, предназначенный для систематического употребления в составе рационов всеми возрастными группами здорового населения, снижающий риск развития заболеваний, связанных с питанием, сохраняющий и улучшающий здоровье, за счет наличия в его составе физиологически функциональных пищевых ингредиентов (ФФПИ). ФФПИ оказывают благоприятный эффект на одну или несколько физиологических функций при систематическом употреблении в количествах, составляющих от 10 до 50% от суточной физиологической потребности. К таким физиологически значимым ингредиентам относятся: витамины, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), минеральные вещества, пищевые волокна, пробиотики, пребиотики, синбиотики, каждый из которых способен повышать регуляторные функции отдельных органов и компенсировать дефицит незаменимых пищевых веществ (Кочеткова, 2011).

Многие ученые обращают внимание на то, что простое наличие ФФПИ в продукте не может определять его функциональные свойства (Arai, 2007). Функциональным продукт становится только после реальных доказательств его способности влиять на конкретные физиологические мишени, улучшать, оптимизировать работу конкретных органов и тканей. К таким доказательствам функциональности продуктов относятся доклинические и клинические исследования, принципы которых заложены в области фармакологии. Причем одним из новых современных подходов для научного обоснования функциональных свойств продукта, содержащих в своем составе ФФПИ, является доклиническая оценка уровня пролиферации и апоптоза клеток различной функциональной специализации в организме подопытных животных (Николаевич, 2011).

Считают, что функциональность пищи зависит не столько от количества входящих в состав продукта ФФПИ, сколько от их биодоступности для организма человека (Дурнев, 2007). Это связано с тем, что далеко не все ФФПИ, поступающие вместе с пищей перорально, попадают в кровоток и в активной форме достигают физиологических мишеней. Учитывая, что большинство пищевых продуктов являются сложными смесями, состоящими из тысяч различных соединений, то введение в эти системы еще одного физиологически

функционального элемента остается для организма незаметным. Так было установлено, что ярко выраженное антимуtagenное свойство определенной смеси микроэлементов не проявлялось при введении ее в состав сложного пищевого продукта (Roberfroid, 2002).

Из этого следует, что наибольший эффект использования ФФПИ может быть достигнут при использовании их в составе малокомпонентных продуктов, представителями которых являются безалкогольные напитки. Они представляют собой практически идеальные продукты для проявления позитивных свойств применяемых ФФПИ, поскольку связаны с таким важным компонентом для рациона человека вода, в которой растворено большинство микронутриентов (Гернет, 2016). Так разработаны функциональные безалкогольные напитки на основе бурых водорослей, хвойного экстракта, виноградного сока с фейхоа, яблочного сока и донника лекарственного, чая, алычи, айвы, концентрированных фруктовых соков – сливового, яблочного, вишневого, виноградного – и пектинового экстракта из яблочных выжимок, экстрактов плодов боярышника и шиповника и другого пряно-ароматического сырья – брусники, мелиссы, душицы, экстракта топинамбура, белков плазмы крови промышленных животных и т.д.

Однако, для достижения физиологического эффекта при создании функциональных безалкогольных напитков ФФПИ должны вноситься в таких количествах, которые могут приводить к нарушению вкусового профиля напитка (Кочеткова, 2011). Для устранения этого недостатка, то есть улучшения органолептических свойств напитка, возникает необходимость использования ароматизаторов, подкислителей, подсластителей, консервантов, многие из них содержат в себе чужеродные химические вещества (ЧХВ) и тем самым нивелируют физиологическую значимость получаемого продукта. Например, известны функциональные пищевые продукты, в состав которых наряду с натуральными растительными компонентами (порошок из шелушенного обыкновенного риса, порошок из шелушенного краснозерного риса), растительными фосфолипидами, аскорбиновой кислотой, входят искусственные вкусоароматические добавки, подсластители, консерванты, которые являются для организма человека источниками ЧХВ. В том числе, это относится и к квасам, технология получения которых основывается на купажировании разведенного с сахарным сиропом ККС и дополнительно внесенными красителями, ароматизаторами, что приводит к снижению органолептических показателей продукта, потере полезных свойств напитка и снижению интереса потребителей к квасу.

Фактически, все существующие в настоящее время функциональные напитки представляют собой продукты, полученные путем механического обогащения их технологическими смесями – премиксами (Шатнюк, 2011). Однако при этом не всегда учитывается, возможность химического взаимодействия микронутриентов как между собой, так и между компонентами, входящими в состав напитка, что может приводить к снижению заявленного физиологического эффекта. Кроме того, наличие в премиксах витаминов, аминокислот, органических кислот, полученных путем химического синтеза, может снивелировать положительный эффект от употребления таких напитков. В первую очередь, это касается нефизиологичных для организма человека D- и DL-форм (рацемические смеси) органических веществ, которые не усваиваются организмом, в отличие от L-форм, характерных для веществ естественного происхождения.

Таким образом, безалкогольные напитки, содержащие в своем составе физиологически значимые ингредиенты, и потому позиционируемые как функциональные продукты, не могут в полной мере считаться таковыми в случае содержания в их составе хотя бы одного компонента, содержащего ксенобиотики. В связи с этим, особую ценность на сегодняшний день представляют собой натуральные функциональные пищевые продукты, которые получают путем ферментации природного растительного и (или) животного сырья для накопления в их составе естественных ФПИ в количестве, составляющем в одной порции продукта не менее 15% от суточной потребности.

Одним из направлений при создании новых функциональных напитков является поиск и изучение новых микроорганизмов, использование которых в технологических процессах ферментации может сообщать им новые функциональные свойства. Причем, применение новых нетрадиционных микроорганизмов является перспективным направлением развития биотехнологии, поскольку открывает возможности практически без капиталовложений интенсифицировать технологический процесс, а также позволяет существенно расширить ассортимент продуктов питания с функциональными и оздоровительными свойствами.

Ярким примером таких продуктов являются безалкогольные ферментированные напитки. Их получают в ходе биоконверсии растительного сырья различными группами микроорганизмов, метаболиты которых – витамины, органические кислоты, аминокислоты и т.д., относятся к ФФПИ естественного происхождения. Такие естественные ФФПИ, в противовес синтетическим, экзогенно внесенным в напитки БАВ, являющихся грубыми стимуляторами, обладают наиболее физиологичной формой для поддержания обменных процессов в организме человека и его функциональных резервов (Антипова, 2002). Таким образом, использование микроорганизмов в технологии напитков, получаемых методом ферментации, позволяет получать продукты питания, обладающие натуральными и функциональными свойствами, а также исключить из состава продукта синтетические пищевые добавки, так как необходимые показатели качества напитков формируются за счет биологически активных метаболитов, продуцируемых развивающимися микроорганизмами. В связи с этим, изыскание и изучение новых высокоэффективных видов микроорганизмов (их сообществ), способных осуществлять процессы сочетанного брожения, является весьма актуальной и важной задачей.

Нами впервые разработано новое биотехнологическое направление в пищевых производствах, основанное на жизнедеятельности естественной полисимбиотической культуры – природного консорциума микроорганизмов *Oryzomyces indici* РГЦ, что позволило решить проблему получения продуктов питания с биологически ценными, пробиотическими и функциональными свойствами. Полученные новые научные знания о видовом составе консорциума *Oryzomyces indici* РГЦ, его токсикологической, гигиенической безопасности, особенностях жизнедеятельности, способности продуцировать различные биологически активные метаболиты, имеющие важное физиологическое значение для организма человека, (витамины, аминокислоты, ферменты, высокомолекулярные и низкомолекулярные органические кислоты и др.), а также продукты обмена веществ, отвечающие за вкусовой и ароматический фон ферментированного продукта, позволили разработать на основе указанной биокультуры новые биотехнологии безалкогольных и алкогольных продуктов брожения функционального назначения.

Особую значимость имеют впервые полученные нами данные о антибиотической активности консорциума микроорганизмов *Oryzomyces indici* РГЦ по отношению к целому ряду патогенных микроорганизмов, а именно: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* и условно-патогенных – *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, развитие которых приводит к нарушению нормального микробиоценоза кишечника человека, известного под названием дисбактериоз (Рис.1).

Обнаружена ярко выраженная антагонистическая активность консорциума *Oryzomyces indici* РГЦ по отношению к золотистому стафилококку *Staphylococcus aureus*, вызывающему ряд тяжелых патологий. Он отличается высокой антибиотикорезистентностью, и в настоящее время нет антибиотика, который подавлял бы развитие этого микроба. Поэтому, обнаруженный факт наличия антагонизма ферментируемого консорциумом *Oryzomyces indici* РГЦ продукта по отношению к *Staphylococcus aureus* имеет большое научно-практическое значение, поскольку свидетельствует о продуцировании рисовым грибом антибиотических веществ, к которым чувствителен золотистый стафилококк.

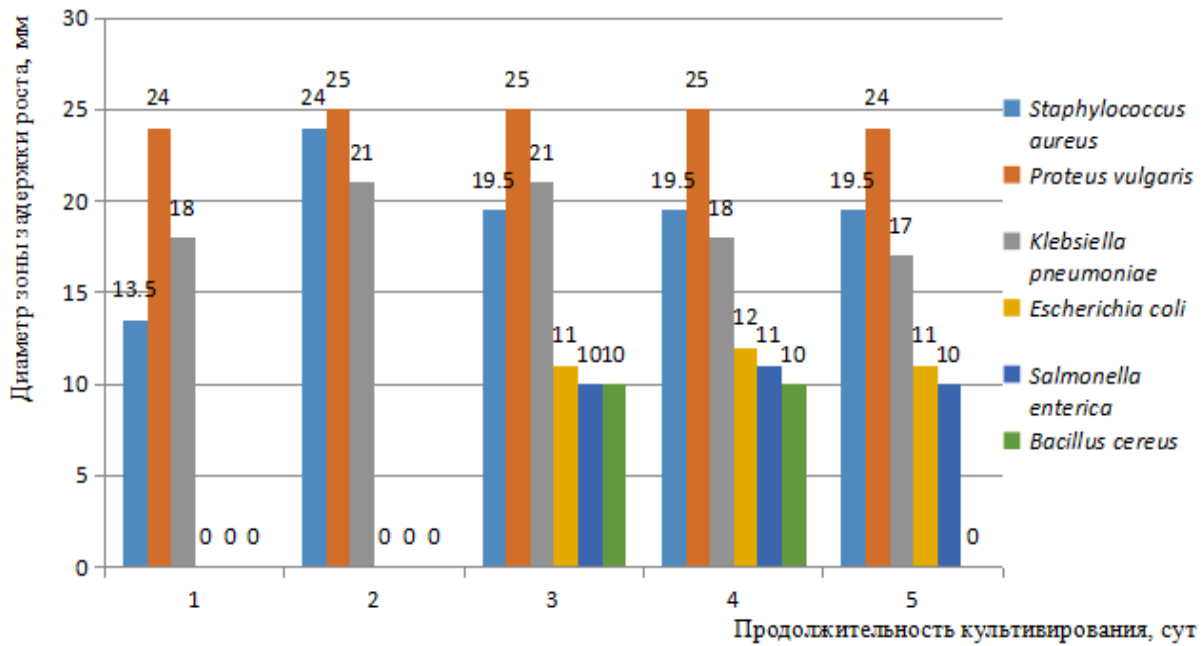


Рис. 1. Антибиотическая активность консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ
Fig.1. Antibiotic activity of the consortium *Oryzomyces indicis* RGC

Таким образом, использование природного консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ в производстве продуктов массового питания позволяет придать им пробиотическую направленность, то есть, способность регулировать биологическое равновесие кишечника, нарушенное при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта человека.

На основании впервые полученных теоретических и экспериментальных результатов исследований кинетики брожения субстрата при использовании в качестве сбраживающего компонента консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ, была разработана комплексная математическая модель процесса ферментации на его основе, отражающая характер метаболических процессов биокультуры и обеспечивающая управление параметрами ферментации в течение всего производственного цикла. Разработанная математическая модель процесса ферментации с использованием консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ была положена в основу инновационной биотехнологии получения натуральных безалкогольных ферментированных напитков серии «Рисовит» (10 видов), выпускаемых на предприятиях Республики Беларусь.

В таблице 1 представлены результаты исследований биохимического состава натурального безалкогольного ферментированного напитка «Рисовит», полученного с использованием консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ. Как свидетельствуют экспериментальные данные, новый напиток обладает высокой биологической ценностью за счет содержания в нем целого спектра биологически активных и физиологически важных для организма человека веществ эндогенного происхождения – витаминов (В₁, В₂, В₃, В_с, Е, РР, С, Р), незаменимых аминокислот, важнейших для организма человека низко- и высокомолекулярных органических кислот, в том числе арахидоновой кислоты (Омега (ω)-б), и др. Наличие в продукте таких физиологически значимых ингредиентов природного происхождения в сочетании с высокими органолептическими свойствами позволило решить проблему создания продуктов питания с оздоровительными свойствами, функциональность которых не вызывает сомнений.

Таким образом, главным достоинством напитков серии «Рисовит» является отсутствие в их составе таких экзогенных неблагоприятных компонентов, как ароматизаторы, консерванты, красители, а также тот факт, что ценные для организма человека биологически

активные вещества в их составе находятся в оптимальной и естественной для нашего организма форме.

Таблица 1. Биохимический состав нового натурального ферментированного безалкогольного напитка «Рисовит»

Table 1. Biochemical composition of a new natural fermented beverage «Risovit»

Наименование показателей	Значение
Массовая доля сухих веществ, %	6,0±0,3
Органические кислоты, г/дм ³ в том числе	
молочная	1,20±0,06
уксусная	0,69±0,03
щавелевая	0,015±0,0008
винная	0,14±0,007
шикимовая	0,0032±0,0002
лимонная	0,01±0,001
янтарная	0,098±0,005
фумаровая	0,0003±0,00001
Кислотность, см ³ раствора гидроксида натрия концентрацией 1 моль/дм ³ на 100 см ³ напитка	1,2±0,1
Содержание этанола, %	0,10±0,01
Содержание редуцирующих сахаров, г/100 см ³ напитка	3,6±0,18
Суммарное количество аминокислот, мг/100 см ³	231,6±46,3
Содержание незаменимых аминокислот, мг/100 см ³	87,7±4,4
Витамин В ₂ , мг/100 г	0,35±0,07
Витамин С, мг/100 г	0,21±0,03
Витамин Е, мг/100 г	1,10±0,22
Витамин В ₁ , мг/100 г	0,04±0,008
Витамин В ₃ , мг/кг	0,23±0,06
Витамин В _с , мкг/100 г	15,0±2,7
Витамин РР, мг/100 г	0,46±0,07
КЭМ	0,62
Летучие ароматические вещества, % об., в том числе	
суммарное содержание альдегидов	(1,93±0,09)×10 ⁻³
содержание эфиров	(1,18±0,06)×10 ⁻³
суммарное содержание высших спиртов	(1,29±0,65)×10 ⁻³
содержание диацетила	(0,07±0,004)×10 ⁻³

Представляло интерес выявить биологические эффекты новых напитков на живой организм, в связи с чем были проведены комплексные доклинические исследования на экспериментальных моделях. Доклиническую оценку свойств напитка «Рисовит» проводили в ГУ НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси». В таблице 2 приведены молекулярно-клеточные характеристики клеток органов различной функциональной направленности (крови, костного мозга, тимуса, селезенки, печени, мышц, семенников) в условиях пролонгированного введения напитка «Рисовит», полученного на основе природного консорциума *Oryzomyces indicii* РГЦ.

Как свидетельствуют полученные данные, по индексу пролиферации в норме клеточные популяции располагались в следующей последовательности: семенники (ИП=22,73 %)→мышцы (ИП=21,26 %)→костный мозг (ИП=20,92 %)→сердце (ИП=19,53%)→тимус (ИП=16,06 %)→селезенка (ИП=12,98 %)→кровь (ИП=12,82 %)→печень (ИП=10,35 %). После введения животным напитка «Рисовит», уровень пролиферации клеток повысился в сердце (+45 %), в семенниках (+40 %), тимусе (+38 %), крови (+29 %), печени (+24 %) и селезенке (+15 %) по отношению к контролю. У этих животных не выявлено изменений пролиферации клеток костного мозга и мышц, по сравнению с контрольными животными.

Таблица 2. Молекулярно-клеточные показатели клеток различных функциональных систем после введения напитка «Рисовит»
Table 2. Molecular and cellular indicators of various functional systems after the introduction of the beverage «Risovit»

Объект исследования	АИ (%)	ИП (%)	G1	S	G2+M
<i>Костный мозг</i>					
Контроль	3,77±0,4	20,92±0,8	79,08±0,8	17,13±0,8	3,78±0,8
Опыт	3,34±0,3	21,05±0,9	78,96±0,9	17,78±0,1	3,26±0,7
<i>Кровь</i>					
Контроль	28,81±0,3	12,82±0,7	87,19±0,7	12,82±0,7	0,0
Опыт	27,45±0,4	16,54±0,2*	83,45±0,2*	16,16±0,2*	0,37±0,2
<i>Тимус</i>					
Контроль	1,8±0,3	16,06±0,51	83,94±0,51	10,82±0,16	5,24±0,49
Опыт	1,79±0,1	22,22±0,23*	77,78±0,23*	11,2±0,19	11,01±0,39*
<i>Селезенка</i>					
Контроль	17,14±0,8	12,98±0,17	87,02±0,17	11,38±0,18	1,6±0,7
Опыт	15,40±1,1	14,93±0,33*	84,65±0,29*	14,93±0,33*	0,8±0,1
<i>Печень</i>					
Контроль	48,2±0,4	10,35±0,26	87,2±0,42	11,53±0,44	1,27±0,8
Опыт	42,51±0,4*	12,8±0,42	89,66±0,26	9,93±0,28	0,41±0,3*
<i>Мышцы</i>					
Контроль	32,27±0,3	21,26±0,7	79,13±0,6	16,47±0,8	4,79±0,18
Опыт	26,4±0,4*	21,77±0,9	80,23±0,1	18,38±0,1	3,39±0,07
<i>Семенники</i>					
Контроль	57,27±0,3	22,73±0,5	77,27±0,5	8,67±0,4	14,06±0,16
Опыт	57,29±0,23	31,89±0,64*	68,61±0,6*	22,56±0,54*	9,33±0,01*
<i>Сердце</i>					
Контроль	44,5±0,5	19,53±0,2	80,47±0,2	17,83±0,4	1,68±0,16
Опыт	37,5±0,5*	28,29±0,3*	71,71±0,26*	28,29±0,26*	1,0±0,1

Примечание: контроль (n=10) – группа животных, получавших воду; опыт (n=10) – группа животных, получавших напиток «Рисовит». *<0,05– значения достоверны между группами.

Обозначения: АИ – апоптотический индекс (отношение доли погибших клеток к общему количеству клеток, выраженное в %); ИП – индекс пролиферации (сумма клеток в стадиях S, G2+M клеточного цикла, выраженная в %); G1 – пресинтетическая стадия интерфазы клеточного цикла (подготовка клеток к делению); S – синтетическая стадия интерфазы клеточного цикла (репликация ДНК и устранение нарушений); G2 – постсинтетическая стадия интерфазы (подготовка клеток к делению); M – митоз (деление клеток).

Note: control (n = 10) - a group of animals that got water; experience (n = 10) - a group of animals that got beverage «Risovit». * <0.05 - values are reliable between groups.

Designations: AI - apoptotic index (ratio of the proportion of dead cells to the total number of cells expressed in %); PI - proliferation index (sum of cells in stages S, G2 + M of cell cycle expressed in %); G1 - presynthetic stage of cell cycle interphase (preparation of the cells for division); S - synthetic stage of cell cycle interphase (DNA replication and elimination of disorders); G2 - postsynthetic stage of interphase (preparation of the cells for division); M - mitosis (cell division).

По отношению к контролю, содержание апоптотических клеток после введения напитка «Рисовит» животным незначительно снижалось в пределах 1 % в тимусе, 8 % – крови, 11 % – костном мозге, 12 % – печени, 16 % – сердце и 18 % – мышцах. В семенниках не выявлено апоптотической гибели клеток после введения напитка животным.

Изучение распределения клеток по стадиям интерфазы клеточного цикла (G1, S, G2, M) показало, что накопление клеток в S-стадии временно блокирует репликацию ДНК клеток с генетическими нарушениями и сопровождается развитием апоптоза. В условиях пролонгированного введения напитка на основе природного консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ животным, отмечена тенденция снижения доли клеток в S-фазе в печени животных и достоверное увеличение клеток селезенки, семенников и сердца, по сравнению с интактным контролем.

Таким образом, повышение уровня пролиферации клеток и понижение количества апоптотических клеток свидетельствуют о стимулирующем действии напитка «Рисовит» на клетки различной функциональной специализации в организме. Наибольший стимулирующий эффект напитка наблюдается в клетках большинства изученных систем (семенники, тимус, сердце, кровь, селезенка, печень).

Были проведены исследования по изучению противоопухолевых свойств напитка «Рисовит», которые оценивали по частоте аденом в легких мышей (напиток вводили животным внутривентрикулярно в течение 30 дней). Исследования проводили на мышах (самцах 2-месячного возраста) линии ISR. Во всех группах (1 – уретан; 2 – рисовый гриб+уретан; 3 – рисовый гриб), кроме интактного контроля (4 группа), мышам внутрибрюшинно вводили уретан в дозе 1,5 мг/г веса. Количество опухолей в легких и частоту опухолеобразования (в процентах) определяли в пересчете на 1 мышь (таблица 3).

Таблица 3. Результаты исследования противоопухолевых свойств напитка «Рисовит»
Table 3. The results of the study of the antitumor properties of the beverage “Risovit”

Количество аденом в легких в расчете на 1 мышь			
Группа 1 (уретан) n=7	Группа 2 (рисовый гриб+уретан) n=8	Группа 3 (рисовый гриб) n=9	Группа 4 (интактный контроль) n=10
16,29±2,09	7,43±1,01	2,89±0,39	3,63±1,0
	P _{1,2} <0,01	P _{1,3} <0,001 P _{2,3} <0,001	P _{1,4} <0,01

Как следует из данных таблицы 3, после внутрибрюшинного введения животным уретана в дозе 1,5 мг/г веса, в легких животных отмечается высокая частота опухолей по сравнению с интактным контролем. На фоне индукции уретаном опухолей в легких и одновременного введения животным напитка наблюдалось снижение – на 46 % – частоты развития аденом в легких этих животных по сравнению с контролем. Кроме того, введение напитка на основе консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ интактным животным не стимулировало процессов опухолеобразования в легких. Выявленные эффекты свидетельствуют об онкопротекторных свойствах напитка на основе консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ по отношению к данной патологии, что указывает на перспективность его использования для создания продуктов питания для онкологических больных.

Заключение

На основании анализа литературных данных показано, что не смотря на большое разнообразие продуктов питания с функциональными свойствами, при создании таких продуктов, и, в частности, безалкогольных напитков, существуют большие сложности. Устранить возникшие проблемы возможно за счет изыскания новых видов микроорганизмов, продукты жизнедеятельности которых наиболее естественны и значимы для организма человека, что будет обеспечивать не только высокие показатели качества готовых напитков, но и повышать их биологическую ценность.

Показана перспективность разработанного нового научного направления в биотехнологиях продуктов брожения, основывающегося на изученных закономерностях

жизнедеятельности природного консорциума *Oryzomyces indicis* РГЦ, что позволило решить проблему получения продуктов питания с биологически ценными, функциональными и стимулирующими свойствами, и разработать инновационные биотехнологии их получения.

Литература

1. Тутельян, В. А. (2007). Предпосылки и факторы формирования региональной политики в области здорового питания в России. *Вопросы питания*. № 6, 39–41.
2. Шендеров, Б. А. (2003). Современное состояние и перспективы развития концепции «функционального питания». *Пищевая пром-ть*, 6, 6–8.
3. Цыганков, В. Г. (2008). Концептуальные вопросы функционального питания : задачи и перспективы. *Сб. науч. статей. – Минск : РУП «Издательский дом «Белорусская наука», Вып. 3 : Питание и обмен веществ*, 287–298.
4. Зуев, Е. Т. (2004). Функциональные напитки: их место в концепции здорового питания. *Пищевая промышленность*, 7, 90–95.
5. Малышев, В.К., Демидова Т. И. (2012). Функциональные продукты питания: особенности современного развития пищевых технологий. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 6, 51–54.
6. Дурнев, А. Д., Оганесянц, Л. А., Лисицын А. Б. (2007). Функциональные продукты питания. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 9, 15–21.
7. Кожевникова, Е. Н. (2012). Продукты с пробиотиками – важное составляющее функционального питания. *Педиатрия*. Т. 91, №4, 72–78.
8. Kwak, S. (2001) Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*. 12, 77–81.
9. Marriott V. M. (2000). Functional foods: an ecologic perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 125–36.
10. Grajek, W. (2005). Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochim. Pol.*, 2005. – 52 p.
11. Тихомирова, Н. А. (2013). Продукты функционального питания. *Молочная пром-ть*. 6, 46–49.
12. Roberfroid, M. V. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *British J. Nutrition*. v.88, 133–138
13. Рябиченко, Т. И. (2016). Использование продукта функционального питания «Бифилина» в детских организованных учреждениях. *Вопросы питания*. Т. 85, 2, 169–170.
14. Кочеткова, А. А., Воробьева, В. М. (2011). Научное обоснование составов и свойств функциональных напитков. *Пиво и напитки*. 6, 18–21.
15. Arai, S. (2002). Recent trends in functional food science and the industry in Japan. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 66, 119–125.
16. Николаевич, Л. Н., Морозова, Е. В. (2011). Научные и практические аспекты нового подхода к оценке свойств функциональных продуктов питания на основе натуральных ингредиентов. *Пищевая промышленность : наука и технологии*. 1, 76–80.
17. Гернет, М. В. (2016). Разработка технологии функциональных напитков брожения с использованием чая. *Пиво и напитки*. 1, 30–34.
18. Шатнюк, Л. Н. (2011). Обогащение напитков. *Пищевая индустрия*. 4/9, 28–30.
19. Антипова, Л. В. (2002). Новые белковые напитки для функционального питания. *Пиво и напитки*. 5, 32–33.

Scientific and Practical Aspects for the Development of Functional Non-alcoholic Fermented Beverages

(Received in January, 2019; Accepted in April, 2019; Available Online from 10th of May, 2019)

Summary

The article discusses conceptual issues related to the development of functional food products, and, in particular, non-alcoholic beverages. This is due to the fact that organoleptic profile of the product can become worse under the mechanical introduction of physiologically significant components into the beverage. To adjust the profile, it is required to use additional components – flavoring and coloring agents, acidifying agents, sweeteners, etc., that can have an adverse effect on a living organism, which levels the functionality of the product. In addition, it is necessary to take into account the bioavailability of physiologically functional food ingredients for the human body, which may not appear in the composition of multicomponent products. In this regard, the functionality of the product requires some proofs, for example, during preclinical trials using absolutely healthy experimental models. This allows to evaluate objectively the effect of the product on physiological targets, which is more difficult to identify in the case of clinical trials.

The development of functional beverages can be realized by finding new types of microorganisms, waste products of which are most natural and significant for the human body, which will ensure not only high quality indicators of the finished beverages, but also increase their biological value.

The authors of the article developed a new direction in biotechnologies of fermentation products based on the studied life patterns of the natural consortium *Oryzomyces indicus* RGC, which made it possible to solve the problem of obtaining food with biologically valuable, functional and stimulating properties and develop innovative biotechnologies for their production. The article first presents the data of the research on the biochemical composition of non-alcoholic fermented drink "Risovit", obtained using the natural consortium *Oryzomyces indicus* PFI and the results of its preclinical trials on animals.