

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.66

EDN: SPNSGI

DOI: 10.21285/achb.986



Перспективы биомониторинга при оценке качества молочного сырья казеинового типа

Ю.В. Щербакова[✉], Ф.Ю. Ахмадуллина, А.С. Сироткин

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань, Российская Федерация

Аннотация. Целью исследования являлась разработка методики биотестирования для оценки качества козьего молока в производственных условиях с использованием бактерий *Escherichia coli* M-180. В качестве основных тест-реакций биомодели были выбраны стрессоустойчивость по отношению к пероксиду водорода с концентрацией в среде 10 мМ и ростовые характеристики (удельная скорость роста и прирост биомассы). Предлагаемый метод оценки качества молока предназначен для термообработанных проб молока в промышленных режимах пастеризации, которые обеспечивают гибель кишечной палочки в нативном молочном сырье. Объектами исследования являлись пробы термообработанного козьего молока со следующими режимами пастеризации: 65 °C, 30 мин; 76 °C, 5 мин; 90 °C, 20 с; 95 °C, 5 мин. На основании серии экспериментальных исследований установлены возможность и перспективность применения метода биотестирования с использованием *Escherichia coli* M-180 как тест-объекта для оценки качества молочного сырья казеинового типа в производственных условиях при его введении в среду культивирования в объемной концентрации $0,125 \times 10^{-3}$ мл/мл среды. Показана высокая чувствительность выбранного биотеста, что подтверждается как ростстимулирующими показателями (скорость роста, прирост биомассы), так и данными по стрессоустойчивости *Escherichia coli* M-180 по отношению к пероксиду водорода. Выявлено, что промышленные режимы пастеризации 76 °C, 5 мин и 90 °C, 20 с являются наиболее эффективными, обеспечивающими наиболее высокую сохранность нативных биологически активных веществ козьего молока.

Ключевые слова: козье молоко, промышленные режимы пастеризации, биотестирование, стрессоустойчивость, кишечная палочка, антиоксиданты

Для цитирования: Щербакова Ю.В., Ахмадуллина Ф.Ю., Сироткин А.С. Перспективы биомониторинга при оценке качества молочного сырья казеинового типа // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. № 3. DOI: 10.21285/achb.986. EDN: SPNSGI.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Prospects for biomonitoring in the quality assessment of casein dairy raw materials

Yulia V. Shcherbakova[✉], Farida Yu. Akhmadullina, Alexander S. Sirotkin

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

Abstract. The study aims to develop a bioassay procedure for assessing goat milk quality under production conditions using *Escherichia coli* M-180 bacteria. The main test reactions of the biomodel yielded resistance to 10 mM hydrogen peroxide and growth characteristics (specific growth rate and biomass accumulation). The proposed method for assessing milk quality is intended for milk samples heat-treated under industrial pasteurization conditions, which ensure the destruction of *Escherichia coli* in native dairy raw materials. The study examined samples of goat milk heat-treated under the following pasteurization conditions: at 65°C for 30 minutes; at 76°C

for 5 minutes; at 90°C for 20 seconds; at 95°C for 5 minutes. A series of experimental studies established the possibility and prospects of using the bioassay procedure with *Escherichia coli* M-180 as the test object (introduced into the culture medium at a volume concentration of 0.125×10^{-3} mL/mL) to assess the quality of casein dairy raw materials under production conditions. The selected bioassay was shown to be highly sensitive, which is confirmed by the growth characteristics (growth rate and biomass accumulation), as well as data on the hydrogen peroxide resistance of *Escherichia coli* M-180. It was found that the industrial pasteurization conditions of 76°C for five minutes and 90°C for twenty seconds are the most effective, ensuring the highest preservation of native biologically active substances in goat milk.

Keywords: goat milk, industrial pasteurization conditions, bioassay, resistance, *Escherichia coli*, antioxidants

For citation: Shcherbakova Y.V., Akhmadullina F.Yu., Sirotkin A.S. Prospects for biomonitoring in the quality assessment of casein dairy raw materials. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(3). (In Russian). DOI: 10.21285/achb.986. EDN: SPNSGI.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что усиливающееся негативное антропогенное воздействие на окружающую среду обусловлено ростом производства, большим количеством образующихся отходов, приводящих к загрязнению биосфера в целом, что создает угрозу здоровью человека. Этому также способствует напряженность социальной обстановки, которая обеспечивает рост развития различных патологий, обусловленных в основном снижением антиоксидантного (защитного) статуса организма [1].

В связи с этим значительно возрастает роль продуктов, богатых нутриентами, обладающих антиоксидантной активностью и обеспечивающих укрепление иммунитета. В то же время использование в сельском хозяйстве химических средств защиты, антибиотиков, синтетических кормовых добавок представляет опасность для современного человека, связанную с возможностью их попадания в продукты, используемые для питания, так как они могут стать причиной пищевых отравлений. Кроме того, применение технологий переработки сельскохозяйственного сырья, приводящих к его обеднению биологически активными веществами, а также переход от системы государственных стандартов к техническим условиям неблагоприятно влияют на качество продуктов агропромышленного комплекса.

В контексте вышесказанного важнейшей приоритетной проблемой сегодняшнего дня в области производства пищевой и сельскохозяйственной продукции является разработка и внедрение в практику экспрессных методов контроля качества как сырья, так и продуктов питания, отличающихся высокой чувствительностью, воспроизводимостью, интегральностью, простотой исполнения анализа и достоверностью, при этом дополняющих действующие методы технохимического контроля.

В последнее время наблюдается рост исследовательской активности в области оценки качества и безопасности молока и продуктов на его основе с учетом уникальных свойств молочного сырья, что обусловлено его обязательностью в рационе разновозрастных групп населения, особенно в зонах повышенного экологического риска [2]. Поскольку молоко является скоропортящимся продуктом, на молочных предприятиях в качестве обязательной технологической стадии предусмотрена его термообработка. Наибольшее применение в практике при термообработке молочного сырья нашел метод пастеризации. При этом обеспечивается:

- достижение санитарно-гигиенических требований

для получения безопасного продукта питания с уничтожением патогенной микрофлоры;

- снижение общей бактериальной обсемененности, разрушение ферментов нативного молочного сырья, которые вызывают порчу молока во время хранения;

- направленное изменение физико-химических свойств молока для получения заданных свойств готового продукта (изменяются органолептические свойства, вязкость, плотность сгустка);

- поддержание оптимальных температурных условий для проведения технологических операций, следующих за тепловой обработкой (заквашивание, сгущение, хранение).

При этом следует отметить, что термообработка неизбежно приводит к снижению биохимической ценности, что связано с изменением структуры и свойств всех фракций молока – белковой, липидной, углеводной, а также низкомолекулярных компонентов молочного сырья, ухудшением его качества, что получило подтверждение в ряде фундаментальных исследований [3, 4] (рис. 1).

В результате в целом снижается содержание нативных биологически активных веществ, характерных для данного уникального и практически основного продукта питания человека, что диктует необходимость использования в производственных условиях экспресс-оценки качества молока, позволяющей осуществлять скрининг рационального способа его термообработки.

Данным требованиям в дополнение к стандартным методам технохимического контроля отвечает метод биотестирования, который базируется на использовании живых модельных организмов.

Если раньше для контроля качества пищевой продукции в качестве биотестов использовали высших животных (кроликов, мышей и т.д.), то в последнее время в качестве альтернативных биотестов все большее внимание привлекают низшие организмы, что обусловлено значительным снижением как временных, так и экономических затрат при проведении аналогичных работ. Как показал анализ научно-технической информации, особый интерес вызывают одноклеточные микроорганизмы, в том числе бактериальные тест-объекты. Это обусловлено коротким циклом их развития и, как следствие, возможностью получения в любое время необходимого количества тест-культур. Тем не менее последние не нашли широкого применения в качестве тест-объектов в интересующей нас области [5].

Настоящее исследование направлено на изучение возможности и перспективности использования биотестов

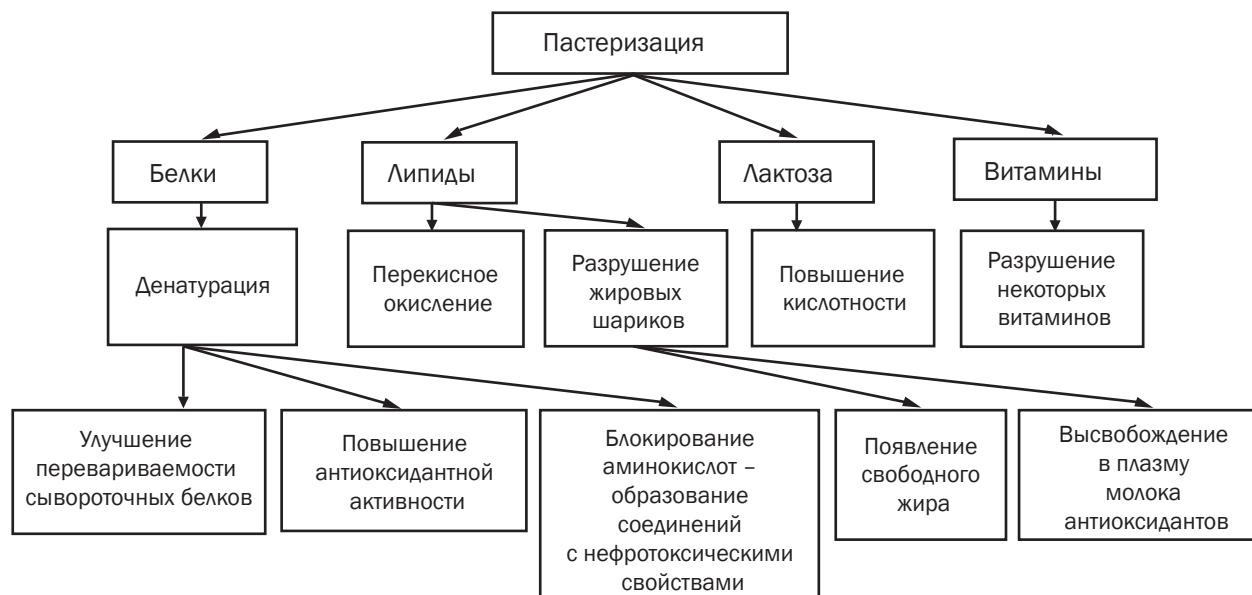


Рис. 1. Влияние пастеризации на качество молока

Fig. 1. Effect of pasteurization on milk quality

для оценки вероятного изменения качественных характеристик козьего молока в производственных условиях при использовании бактериального тест-объекта.

Выбор альтернативного молочного сырья обусловлен возросшей тенденцией увеличения числа и мощности хозяйств, занимающихся разведением коз, что объясняется, в частности, экономической целесообразностью. Кроме того, козье молоко и товарная продукция на его основе привлекают все большее внимание диетологов и педиатров ввиду высокой пищевой и биохимической ценности этого вида сельскохозяйственного сырья и его мощной антиоксидантной системы, обуславливающей его лечебно-профилактические свойства [6].

Целью проведенного исследования являлась разработка методики биотестирования козьего молока при использовании в качестве биотеста *Escherichia coli*.

К задачам, решаемым в работе, относятся:

- скрининг рациональных условий биотестирования козьего молока;
- биодиагностика качества молочного сырья в процессе его термообработки;
- оценка влияния промышленных режимов термообработки на качество молочного сырья.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования являлись пробы нативного и термообработанного молока коз зааненской породы возраста 1,5–7 лет, отобранного из личных хозяйств. Термообработку проб молочного сырья (40 мл) проводили с учетом промышленных режимов пастеризации (65 °C, 30 мин; 76 °C, 5 мин; 90 °C, 20 с; 95 °C, 5 мин) при условии максимально возможного сокращения времени предварительного нагрева молока до исследуемого режима пастеризации. Пробы молочного сырья погружали в водянную баню, нагретую до 100 °C, и интенсивно перемешивали до достижения необходимой температуры термообработки (65, 76, 90, 95 °C), после чего нагрев

пробы молока продолжали на водянной бане с соответствующими температурами воды (67–68, 78–80 °C) за исключением проб, нагреваемых выше 90 °C.

Приготовление инокулята. При проведении исследования в качестве тест-объекта использовалась суточная культура *E. coli* M-180 из коллекции микроорганизмов Казанского (Приволжского) федерального университета, выращенная на плотной питательной среде (мясопептонном агаре) при температуре 37 °C.

Инокулят тест-объекта готовили на минеральной среде М9 следующего состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1,5 г), Na_2SO_4 (0,6 г), CaCl_2 (0,01 г), NH_4Cl (1 г), KH_2PO_4 (3 г), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 г), глюкоза (0,5 г), дистиллированная вода (1000 мл). Для культивирования инокулята использовали плоскодонные конические колбы объемом 250 мл. В них вносили приготовленную минеральную среду в количестве 40 мл. Колбы со средой автоклавировали при 0,5 ати в течение 20 мин. Затем в остывшие колбы стерильно делали смыв бактериальных культур с плотной питательной среды (мясопептонного агара) для приготовления инокулята. Инокулят культивировали в течение суток на качалках со скоростью вращения 150 об/мин при температуре 35 °C.

Проведение биотестирования. При проведении биотестирования в колбы со средой М9 стерильно вносили суточный инокулят бактериальной культуры из расчета начальной оптической плотности, приблизительно равной 0,1, с последующим добавлением проб молока. Клетки *E. coli* M-180 культивировали в аэробных условиях на качалках со скоростью вращения 150 об/мин при температуре 35 °C. За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности среды культивирования с инокулятом, измеряемой на фотоколориметре КФК-2 (АО «ЗОМС», Россия) при $\lambda = 590$ нм в кварцевых кюветах 1 см через каждые 30 мин.

Скорость роста V , ед. оптической плотности в %, рассчитывали для логарифмической фазы на кривой роста по следующей формуле:

$$V = \frac{D_k - D_n}{t},$$

где D_k – оптическая плотность, соответствующая концу экспоненциальной фазы роста, % от начального значения оптической плотности; D_n – оптическая плотность, соответствующая началу экспоненциальной фазы роста, % от начального значения оптической плотности; t – продолжительность экспоненциальной фазы роста, ч.

Оценка стрессоустойчивости тест-объекта. При исследовании стрессоустойчивости тест-объекта в середине логарифмической фазы роста бактериальной культуры создавали условия окислительного стресса путем внесения в питательную среду пероксида водорода с концентрацией в среде 10 мМ. До внесения пероксида водорода и через 30 мин после его внесения определяли количество колоний *E. coli* в каждой колбе методом высеивов проб на плотную питательную среду Эндо, являющуюся слабоселективной дифференциальной-диагностической средой для выделения бактерий группы кишечной палочки [7].

В пробах молока дополнительно оценивали общее количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов с помощью высеивов на плотную питательную среду КМАФАНМ следующего состава: пептон из казеина (5 г), дрожжевой экстракт (2,5 г), сухое молоко обезжиренное (1 г), глюкоза (1 г), agar-agar (10,5 г), дистиллированная вода (1000 мл) [8].

Определение супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$) в термообработанных пробах молочного сырья. Сущность метода заключается в превращении адреналина (эпинефрина) – акцептора электронов – в аденохром при взаимодействии с супероксид-анионом. При этом происходит окрашивание раствора, интенсивность которого измеряют на спектрофотометре.

Так как молоко является гетерогенной системой, что затрудняет применение для него спектрофотометрических методов, определение генерации супероксид-аниона проводили для сыворотки. Для этого в чистые центрифужные пробирки вносили по 8 мл пробы молока и 10% раствора трихлоруксусной кислоты; содержимое перемешивали и центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин, после чего сыворотку в объеме 40 мл подвергали термообработке. Термообработанную пробу

быстро охлаждали в контейнере со льдом с последующим определением супероксид-аниона. Для этого в пробирке смешивали 50 мкл соответствующей молочной пробы с 1 мл раствора 1 мМ адреналина (рН 6,8). О генерации $O_2^{\cdot-}$ судили по превращению адреналина в течение 15 мин в аденохром. Реакцию останавливали внесением 50 мкл 0,05н HCl. Определение оптической плотности проводили при длине волн 480 нм с использованием в кювете сравнения дистиллированной воды вместо молочной пробы.

Концентрацию аденохрома M , М/мл $\times 10^{-5}$, рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{E}{\varepsilon \times l},$$

где E – оптическая плотность, ед. оптической плотности; ε – молярная экстинкция вещества, равная $4020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; l – длина кюветы, равная 1,05 мм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При разработке биометода оценки качества термообработанного козьего молока была использована тестовая биосистема *E. coli* M-180, которая отличается высокой чувствительностью, скоростью роста, низкой затратностью, обуславливает экспрессность предлагаемого метода и, что самое главное, позволяет оценить изменение антиоксидантных свойств при тепловой обработке. В производственных условиях это дает возможность осуществить достоверный выбор наиболее рационального способа термообработки козьего молока, обеспечивающего максимально возможную сохранность нативных биологически активных веществ исходного сырья.

В качестве основных тест-реакций биомодели были выбраны стрессоустойчивость и ростовые характеристики – скорость роста и прирост биомассы.

Метод биодиагностики предназначен только для термообработанных проб козьего молока при промышленных режимах пастеризации, обеспечивающих полное уничтожение (гибель) кишечной палочки нативного молочного сырья, что экспериментально подтверждалось в каждом опыте (табл. 1).

Выбор синтетической среды М9 для культивирования тест-объекта был обусловлен необходимостью

Таблица 1. Содержание бактерий группы *Escherichia coli*, КОЕ/см³, в нативном и пастеризованном козьем молоке

Table 1. Content of *Escherichia coli* bacteria, CFU/cm³, in native and pasteurized goat's milk

Номер опыта	Режим пастеризации				
	Нативное молоко	65 °C, 30 мин	76 °C, 5 мин	90 °C, 20 с	95 °C, 5 мин
1	111000	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
2	122000	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
3	45600	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
4	86300	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
5	137000	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
6	52300	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
7	87500	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
8	100000	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.
9	113000	H.o.	H.o.	H.o.	H.o.

Примечание. H.o. – не обнаружено.

выявления влияния биологически активных веществ компонентов молока, включая белки, аминокислоты, витамины и т.д. Проведенные исследования в серии опытов подтвердили перспективность ее использования: высокая оптическая плотность инокулята, его однородность, быстрый выход на стационарную фазу роста за 2–3 ч позволили рекомендовать этот метод биотестирования в качестве экспрессного и осуществить подробный анализ кривых роста культуры (табл. 2, 3).

Таблица 2. Показатели инокулята бактерии *Escherichia coli* M-180 на питательной среде М9

Table 2. Indicators of the inoculum of the bacterium *Escherichia coli* M-180 cultivated on the nutrient medium M9

Номер опыта	Показатель	Значение
1	Характеристика	Мутный, однородный
	Оптическая плотность	0,20
2	Характеристика	Мутный, однородный
	Оптическая плотность	0,21
3	Характеристика	Мутный, однородный
	Оптическая плотность	0,20
4	Характеристика	Мутный, однородный
	Оптическая плотность	0,22
5	Характеристика	Мутный, однородный
	Оптическая плотность	0,21

При разработке биоаналитического метода предварительно определяли концентрацию козьего молока, вносимого в среду культивирования тест-объекта. Диапазон варьирования концентраций молока составил от $0,125 \times 10^{-3}$ до $0,5 \times 10^{-3}$ мл/мл среды (рис. 2) с учетом необходимой оценки влияния комплекса биологически активных веществ козьего молока, которые могут проявлять свое действие в сверхмальных дозах [9, 10].

Согласно полученным данным, наилучшие результаты при проведении биотестирования термообработанных проб молочного сырья были получены при добавлении козьего молока в среду культивирования в концентрации $0,125 \times 10^{-3}$ мл/мл среды.

Обобщенные результаты серии экспериментальных исследований по влиянию козьего молока при различных режимах его термообработки на рост биотеста приведены на рис. 3.

Оценка качества молока после его термообработки осуществлялась по основному показателю роста бак-

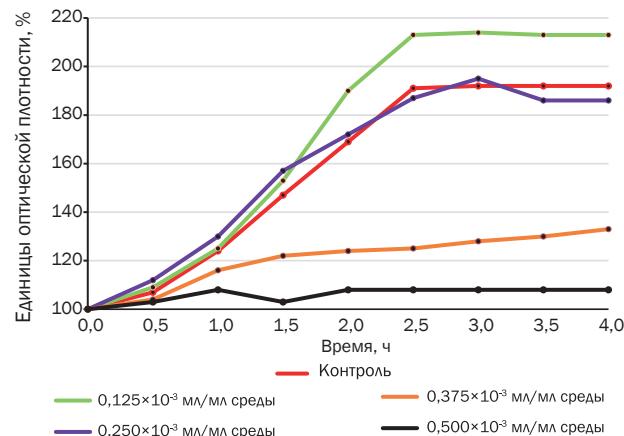


Рис. 2. Влияние козьего молока на рост культуры *Escherichia coli* M-180 в концентрациях от $0,125 \times 10^{-3}$ до $0,5 \times 10^{-3}$ мл/мл среды

Fig. 2. Goat's milk effect on the growth of *Escherichia coli* M-180 culture at the concentrations from 0.125×10^{-3} to 0.5×10^{-3} ml/ml of medium

териальной культуры – скорости роста, которая определяется полноценностью состава среды культивирования.

Получено однозначное экспериментальное подтверждение о достоверном различии скоростей роста тест-культуры при добавлении в среду культивирования пастеризованного при различных режимах молочного сырья. При этом тенденции изменения скоростей роста бактериальной культуры в зависимости от пробы пастеризованного молока от опыта к опыту повторяются. Следует отметить как увеличение, так и снижение ростстимулирующих свойств термообработанного козьего молока по сравнению с контролем. Наиболее вероятное объяснение наблюдаемого факта заключается в различии в нативном составе исследуемых образцов молочного сырья, зависящем от ряда факторов, включающих старение, возраст животного и рацион питания.

Что касается термообработанных проб, то в подавляющем большинстве проведенных экспериментов (~94%) наибольшими ростстимулирующими свойствами обладали пробы молока, обработанного в режимах 76 °C, 5 мин и 90 °C, 20 с. При этом необходимо отметить, что в ряде экспериментов (~ 33%) удельные скорости роста тест-объекта были сопоставимы для данных режимов.

Вероятно, данные режимы тепловой обработки обеспечивают как наибольшую сохранность нативных антиоксидантов молочного сырья, так и дополнительное высвобождение в плазму молока ряда биологически активных компонентов, которые могут служить для данной

Таблица 3. Фазы роста *Escherichia coli* M-180 на питательной среде М9

Table 3. Growth phases of *Escherichia coli* M-180 cultivated on M9 nutrient medium

Номер опыта	Лаг-фаза, ч	Экспоненциальная фаза, ч	Фаза замедления, ч	Стационарная фаза, ч
1	С 0 по 0,5	С 0,5 по 1,5	С 1,5 по 2,0	С 2,0
2	С 0 по 0,5	С 0,5 по 1,5	С 1,5 по 2,0	С 2,0
3	С 0 по 0,5	С 0,5 по 1,5	С 1,5 по 2,0	С 2,0
4	С 0 по 0,5	С 0,5 по 1,5	С 1,5 по 2,0	С 2,0
5	С 0 по 0,5	С 0,5 по 1,5	С 1,5 по 2,5	С 2,5

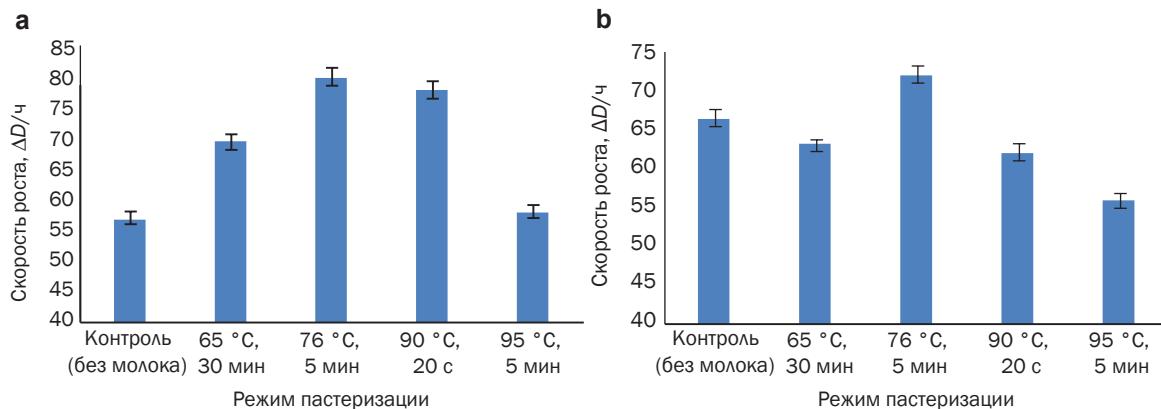


Рис. 3. Влияние козьего молока при различных режимах термообработки на рост культуры *Escherichia coli* M-180:
а, б – разные доноры молока

Fig. 3. Goat's milk effect on the growth of *Escherichia coli* M-180 culture under different heat treatment conditions:
a, b – different milk donors

бактериальной культуры факторами роста – витаминов, аминокислот, низкомолекулярных пептидов [11, 12].

Более жесткие режимы пастеризации молока приводят к снижению его ростстимулирующих свойств, что, согласно данным литературы, связано с более глубокими деструкционными процессами, протекающими при термообработке, обусловливающими снижение концентрации антиоксидантов – факторов роста. Этому также способствует более интенсивное образование активных форм кислорода при жестких режимах тепловой обработки, негативно влияющих на противоокислительные свойства молока. Данный факт подтверждается проведенными нами исследованиями в области образования супероксид-анион радикала, являющегося родоначальником всех активных форм кислорода (табл. 4), для проб молока различных доноров. В соответствии с общепринятой концепцией [3, 13–15] недостаток в организме природных антиоксидантов (в нашем случае экспериментов с добавлением молока, обработанного при жестких режимах пастеризации, с более низкой антиоксидантной активностью) приводит к интенсификации окислительных процессов в липидах клеточных мембран и к появлению в них большого количества продуктов окисления. Известно, что продукты перекисного окисления липидов являются ингибиторами клеточного размножения и повышение или понижение их концентрации соответственно приводит к замедлению или ускорению клеточного деления, что сказывается на скорости роста [14, 15].

Таблица 4. Влияние термообработки на содержание супероксид-аниона, М/мл×10⁻⁵

Table 4. Heat treatment effect on the superoxide anion content, M/ml×10⁻⁵

Номер донора	Режим пастеризации			
	65 °C, 30 мин	76 °C, 5 мин	90 °C, 20 с	95 °C, 5 мин
1	1,64±0,10	1,40±0,09	1,47±0,06	1,83±0,08
2	1,82±0,08	1,74±0,07	1,87±0,12	2,05±0,10
3	4,65±0,25	1,99±0,11	2,40±0,12	3,36±0,15
4	6,12±0,12	2,37±0,23	3,40±0,11	3,80±0,12
5	4,79±0,21	1,06±0,21	1,72±0,11	1,84±0,07
6	8,54±0,18	5,71±0,15	5,98±0,21	5,60±0,25
7	7,64±0,23	4,72±0,09	5,15±0,09	6,88±0,10

Наличие факторов роста в среде культивирования должно сопровождаться приростом биомассы. В связи с этим в работе наряду с изменением скорости роста бактериальной культуры оценивали прирост биомассы (в процентах по отношению к начальному значению оптической плотности) (рис. 4).

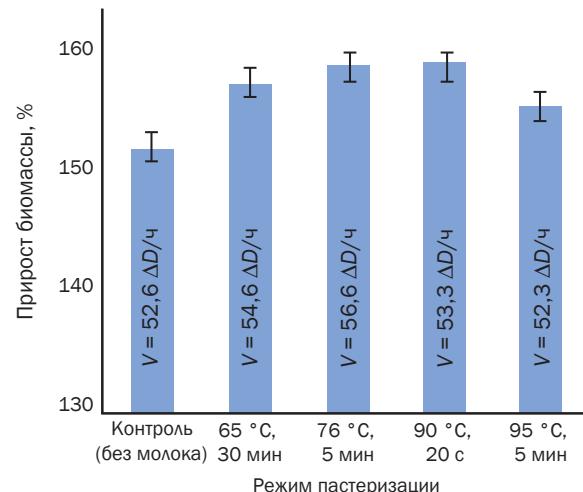


Рис. 4. Влияние пастеризованного молока на скорость роста и прирост биомассы культуры *Escherichia coli* M-180

Fig. 4. Pasteurized milk effect on the growth rate and biomass growth of *Escherichia coli* M-180 culture

Следует отметить хорошее согласование результатов, полученных в отношении влияния режима термообработки на два параметра роста тест-культуры – скорость роста и прирост биомассы.

Наряду с ростовыми характеристиками в ходе работы дополнительно изучали влияние режимов пастеризации козьего молока на стрессоустойчивость контрольного тест-объекта. В качестве стрессора была выбрана перекись водорода, которая является индикатором повреждения преимущественно липидной части мембранны. Использовалась перекись водорода в концентрации 10 mM, вызывающая пероксидный стресс у выбранного тест-объекта и обладающая по отношению к нему бактерицидным действием [16].

Критерием оценивания в данной серии экспериментов являлась выживаемость *E. coli* в условиях пероксидного стресса – количество выросших колоний бактериальной культуры после обработки перекисью водорода в течение 30 мин, выраженное в процентах по отношению к количеству колоний кишечной палочки до стресса.

При проведении исследований на этом этапе предварительно определяли необходимое разведение изучаемых проб для высеива на среду Эндо в соответствии с описанием, приведенным в экспериментальной части данной статьи (табл. 5).

В результате исследований была показана необходимость разведения 1:10⁶ и 1:10⁵ до и после внесения стрессора в исследуемые пробы среды культивирования тест-объекта соответственно.

При оценке влияния режима термообработки молока на стрессоустойчивость биотеста эксперименты проводили аналогично с учетом установленного разведения, сопоставляя изменение обсемененности исследуемых проб в относительных единицах (рис. 5). В качестве контроля служили пробы без добавления молока.

Наибольшая выживаемость бактериальной культуры в условиях стресса, вызванного действием перекиси водорода, наблюдается при добавлении в синтетическую среду культивирования *E. coli* M-180 козьего молока, обработанного при режимах пастеризации 76 °C, 5 мин и 90 °C, 20 с. Очевидно, данные режимы позволяют сохранить компоненты молока, которые препятствуют протеканию окислительного стресса, способствуя сохранению колониеобразующих частиц бактериальной культуры. Кроме того, тепловая обработка при высоких температурах (76, 90 °C) и малом времени выдержки (5 мин, 20 с) обеспечивает уменьшение соединений, обладающих ингибирующим действием по отношению к бактериальной культуре,

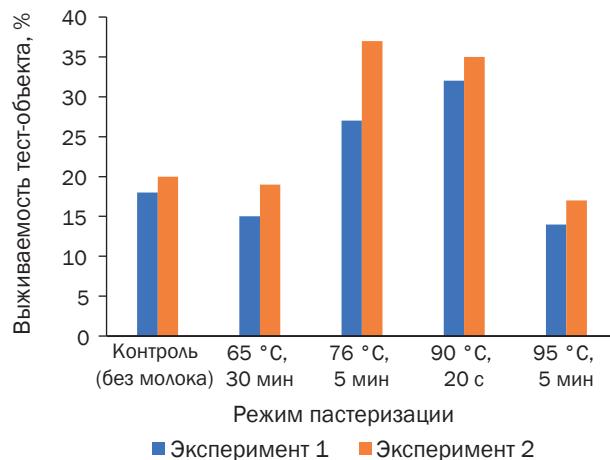


Рис. 5. Влияние термообработанного козьего молока на стрессоустойчивость бактерии *Escherichia coli* M-180

Fig. 5. Heat-treated goat's milk effect on the stress resistance of the bacterium *Escherichia coli* M-180

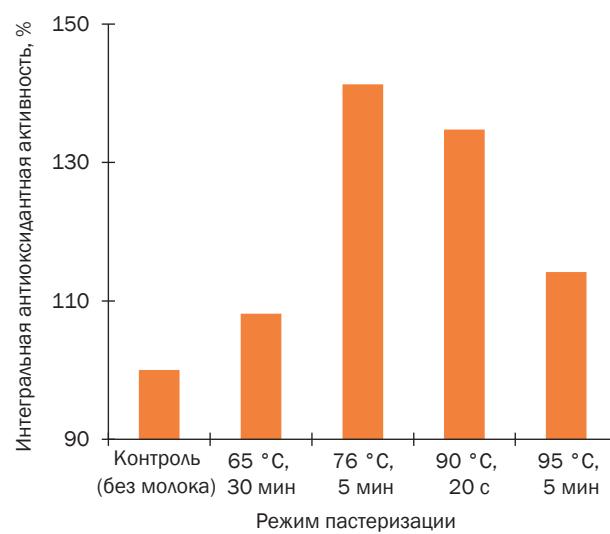


Рис. 6. Влияние режимов термообработки молочного сырья казеинового типа на его интегральную антиоксидантную активность

Fig. 6. Heat treatment modes effect of casein-type dairy raw materials on its integral antioxidant activity

Таблица 5. Разведения исследованных проб бактериальной культуры *Escherichia coli* M-180 для высеива на среду Эндо в середине логарифмической фазы роста

Table 5. Dilution of the studied samples of *Escherichia coli* M-180 bacterial culture for seeding on Endo medium in the middle of the logarithmic growth phase

Номер пробы	Разведение исследованных проб											
	до стресса						после стресса					
	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶
1	∞	∞	∞	∞	1000	240	∞	∞	∞	∞	220	20
2	∞	∞	∞	∞	1220	190	∞	∞	∞	∞	140	6
3	∞	∞	∞	∞	1170	130	∞	∞	∞	∞	150	9

таких как ряд ферментов, продуцирующих активные формы кислорода, например ксантинооксидаза, а также выход в плазму молока дополнительных факторов роста за счет процессов деструктурирования веществ – их источников. К ним относятся микро- и макроэлементы, аминокислоты, низкомолекулярные пептиды, ряд витаминов. Известно, что практически все эти факторы роста обладают антиоксидантной активностью. В связи с этим клеточная популяция микроорганизмов, выращенная в среде, богатой антиоксидантами (пробы с добавлением молока, обработанного при режимах 76 °C, 5 мин и 90 °C, 20 с), характеризуется повышенной физиологической активностью и более высокими адаптационными способностями, что согласуется с литературными данными [17–20].

Результаты собственных исследований по суммарной противокислительной активности козьего молока, обработанного при вышеуказанных режимах, полученных методом гальваностатической кулонометрии [3], хорошо согласуются с результатами проведенной биодиагностики (рис. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенной работы на основании серии экспериментальных исследований установлена возможность и перспективность применения метода биотестирования с использованием бактерий *E. coli* M-180 как тест-объекта для оценки качества козьего молока в производственных условиях при его введении в среду культивирования в объемной концентрации $0,125 \times 10^{-3}$ мл/мл среды. Показана высокая чувствительность выбранного биотеста, что подтверждается как ростстимулирующими показателями (скорость роста, прирост биомассы), так и данными стрессоустойчивости *E. coli* M-180 по отношению к пероксиду водорода. Выявлено, что промышленные режимы пастеризации 76 °C, 5 мин и 90 °C, 20 с являются наиболее эффективными, обеспечивающими наиболее высокую сохранность нативных биологически активных веществ козьего молока.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Кравченко С.Д., Козлова Н.М., Тирикова О.В., Бахтаирова В.И. Антиоксиданты как потенциальные биомаркеры стадий неалкогольной жировой болезни печени // Байкальский медицинский журнал. 2023. Т. 2. N 4. С. 24–32. DOI: 10.57256/2949-0715-2023-4-24-32. EDN: FVUEEA.
2. Чаплыгина О.С., Козлова О.В., Жарко М.Ю., Петров А.Н. Оценка биологической безопасности молочных продуктов, содержащих антибиотики // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. N 1. С. 192–201. DOI: 10.21603/2074-9414-2023-1-2427. EDN: MGZXF.
3. Щербакова Ю.В., Ахмадуллина Ф.Ю., Егорова Е.А. Перспективы использования метода гальваностатической кулонометрии для оценки интегральной антиоксидантной активности молока и кисломолочной продукции: монография. Казань: Изд-во КНИТУ, 2019. 128 с.
4. Щербакова Ю.В., Семенова Ю.В., Багаутдинова Г.Р., Насрулина К.А., Ахмадуллина Ф.Ю. Метод биотестирования для контроля качества молочного сырья при промышленных режимах термообработки // Химическая безопасность. 2020. Т. 4. N 2. С. 282–292. DOI: 10.25514/CHS.2020.2.18020. EDN: PCMCTH.
5. Зарицкая Е.В., Полозова Е.В., Шилов В.В., Богачева А.С. Современные альтернативные методы исследования, используемые для оценки безопасности продукции // Экология человека. 2017. N 3. С. 21–25. DOI: 10.33396/1728-0869-2017-3-21-25. EDN: XXRUYR.
6. Симоненко С.В., Фелик С.В., Симоненко Е.С., Антипова Т.А., Шувариков А.С., Пастух О.Н. Козье молоко – ценное сырье для производства детских молочных продуктов // Овцы, козы, шерстяное дело. 2017. N 4. С. 35–36. EDN: ZXKVKF.
7. Юшин Ю.В., Подкопайло Р.В., Петрова Д.А., Егоров К.А., Трухин В.П. Обзор питательных сред, используемых для культивации рекомбинантной *Escherichia coli* // Медицина экстремальных ситуаций. 2019. Т. 21. N 3. С. 444–453. EDN: IJNIDN.
8. Knysh A., Sokolov P., Nabiev I. Dynamic light scattering analysis in biomedical research and applications of nanoparticles and polymers // Journal of Biomedical Photonics and Optics. 2023. Vol. 10. No. 1. P. 1–10. DOI: 10.1007/s11344-023-00001-1. EDN: JBPOL.
9. Zarkovic N. Antioxidants and second messengers of free radicals // Antioxidants. 2018. Vol. 7, no. 11. P. 158. DOI: 10.3390/antiox7110158.
10. Zarkovic N. Roles and functions of ROS and RNS in cellular physiology and pathology // Cells. 2020. Vol. 9, no. 3. P. 767. DOI: 10.3390/cells9030767.
11. Bzducha-Wróbel A., Pobiega K., Błażejak S., Kieliszek M. The scale-up cultivation of *Candida utilis* in waste potato juice water with glycerol affects biomass and β(1,3)/(1,6)-glucan characteristic and yield // Applied Microbiology and Biotechnology. 2018. Vol. 102. P. 9131–9145. DOI: 10.1007/s00253-018-9357-y.
12. Kieliszek M., Błażejak S., Bzducha-Wróbel A., Kot A.M. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells // Molecular Biology Reports. 2019. Vol. 46, no. 2. P. 1797–1808. DOI: 10.1007/s11033-019-04630-z.
13. Брусков В.И., Черников А.В., Гудков С.В., Масалимов Ж.К. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла // Биофизика. 2003. Т. 48. N 6. С. 1022–1029. EDN: OPJFND.
14. Иванов В.Е., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла в растворах желатина и казеина // Биофизика. 2018. Т. 63. N 5. С. 873–879. DOI: 10.1134/S0006302918050058. EDN: UZHUYS.
15. Беловолова Л.В. Активные формы кислорода в водных средах (обзор) // Оптика и спектроскопия. 2020. Т. 128. N 7. С. 923–942. DOI: 10.21883/OS.2020.07.49565.64-20. EDN: KDOPYB.
16. Самойлова З.Ю., Безматерных К.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. Оценка пребиотической активности экстрактов растений для разработки препаратов, стимулирующих кишечную микрофлору // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2016. N 4. С. 362–367. EDN: XDYBLR.
17. Huang M.L.-H., Chiang S., Kalinowski D.S., Bae D.-H., Sahni S., Richardson D.R. The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: cross-talk between antioxidant defense, auto-

phagy, and apoptosis // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019. P. 6392763. DOI: 10.1155/2019/6392763.

18. Кузник Б.И., Линькова Н.С., Ивко О.М. Оксидативный стресс, старение и короткие пептиды // Успехи физиологических наук. 2021. Т. 52. № 2. С. 13–20. DOI: 10.31857/S0301179821020041. EDN: DSCWEW.

19. Cabello-Verrugio C., Simon F., Trollet C., Santibañez J.F. Oxidative stress in disease and aging: mechanisms

and therapies 2016 // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017. P. 4310469. DOI: 10.1155/2017/4310469.

20. Мартусевич А.К., Карузин К.А. Метаболическая оценка эффективности применения витаминно-минеральных комплексов у профессиональных спортсменов // Вопросы питания. 2021. Т. 90. № 1. С. 94–101. DOI: 10.33029/0042-8833-2021-90-1-94-101. EDN: YZEGGG.

REFERENCES

- 1.** Kravchenko S.D., Kozlova N.M., Tirikova O.V., Bakhaitrova V.I. Antioxidants as potential biomarkers of non-alcoholic fatty liver disease stages. *Baikal Medical Journal*. 2023;2(4):24-32. (In Russian). DOI: 10.57256/2949-0715-2023-4-24-32. EDN: FVUEEA.
- 2.** Chaplygina O.S., Kozlova O.V., Zharko M.Yu., Petrov A.N. Assessing the biological safety of dairy products with residual antibiotics. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2023;53(1):192-201. (In Russian). DOI: 10.21603/2074-9414-2023-1-2427. EDN: MGZXCF.
- 3.** Shcherbakova Yu.V., Akhmadullina F.Yu., Egorova E.A. *Prospects for using the galvanostatic coulometry method to assess the integral antioxidant activity of milk and fermented milk products*. Kazan: Kazan National Research Technological University; 2019, 128 p. (In Russian).
- 4.** Shcherbakova Yu.V., Semenova Yu.V., Bagautdinova G.R., Nasrulina K.A., Akhmadullina F.Yu. Biotesting approach for quality control of dairy raw materials under industrial heat treatment modes. *Chemical Safety Science*. 2020;4(2):282-292. (In Russian). DOI: 10.25514/CHS.2020.2.18020. EDN: PCMCTH.
- 5.** Zaritskaya E.V., Polozova E.V., Shilov V.V., Bogacheva A.S. Present alternative study methods used in product safety assessment. *Human Ecology*. 2017;3:21-25. DOI: 10.33396/1728-0869-2017-3-21-25. EDN: XXRUYR. (In Russian).
- 6.** Simonenko S.V., Felik S.V., Simonenko E.S., Antipova T.A., Shuvarikov A.S., Pastukh O.N. Goat milk – a valuable raw material for the production of baby dairy products. *Sheep, Goats, Wool Business*. 2017;4:35-36. (In Russian). EDN: ZXKVKF.
- 7.** Yushin Yu.V., Podkopailo R.V., Petrova D.A., Egorov K.A., Trukhin V.P. Review of nutrient media used for cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Meditina ekstremal'nykh situatsii*. 2019;21(3):444-453. (In Russian). EDN: IJNIDN.
- 8.** Knysh A., Sokolov P., Nabiev I. Dynamic light scattering analysis in biomedical research and applications of nanoparticles and polymers. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. 2023;9(2):020203. DOI: 10.18287/JBPE23.09.020203.
- 9.** Zarkovic N. Antioxidants and second messengers of free radicals. *Antioxidants*. 2018;7(11):158. DOI: 10.3390/antiox7110158.
- 10.** Zarkovic N. Roles and functions of ROS and RNS in cellular physiology and pathology. *Cells*. 2020;9(3):767. DOI: 10.3390/cells9030767.
- 11.** Bzducha-Wróbel A., Pobiega K., Błażejak S., Kieliszek M. The scale-up cultivation of *Candida utilis* in waste potato juice water with glycerol affects biomass and β (1,3)/(1,6)-glucan characteristic and yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102:9131-9145. DOI: 10.1007/s00253-018-9357-y.
- 12.** Kieliszek M., Błażejak S., Bzducha-Wróbel A., Kot A.M. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(2):1797-1808. DOI: 10.1007/s11033-019-04630-z.
- 13.** Bruskov V.I., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Masalimov Zh.K. Thermal activation of the reducing properties of seawater anions. *Biofizika*. 2003;48(6):1022-1029. (In Russian). EDN: OPJFND.
- 14.** Ivanov V.E., Chernikov A.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. The formation of long-lived reactive protein species in heat-treated solutions of gelatin and casein. *Biofizika*. 2018;63(5):873-879. (In Russian). DOI: 10.1134/S0006302918050058. EDN: UZHUYS.
- 15.** Belovolova L.V. Reactive oxygen species in aqueous media (a review). *Optika i spektroskopiya*. 2020;128(7):923-942. (In Russian). DOI: 10.21883/OS.2020.07.49565.64-20. EDN: KDOPYB.
- 16.** Samoilova Z.Yu., Bezmaternykh K.V., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N. Evaluation of prebiotic activity of plant extracts towards development of preparations stimulating intestinal microflora. *Bulletin of Perm University. Biology*. 2016;4:362-367. (In Russian). EDN: XDYBLR.
- 17.** Huang M.L.-H., Chiang S., Kalinowski D.S., Bae D.-H., Sahni S., Richardson D.R. The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;6392763. DOI: 10.1155/2019/6392763.
- 18.** Kuznik B.I., Linkova N.S., Ivko O.M. Oxidative stress, aging and short peptides. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2021;52(2):13-20. (In Russian).
- 19.** Cabello-Verrugio C., Simon F., Trollet C., Santibañez J.F. Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies 2016. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;4310469. DOI: 10.1155/2017/4310469.
- 20.** Martusevich A.K., Karuzin K.A. Metabolic estimation of efficiency of vitamin and mineral complexes in qualified athletes. *Voprosy pitaniya*. 2021;90(1):94-101. (In Russian). DOI: 10.33029/0042-8833-2021-90-1-94-101. EDN: YZEGGG.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Щербакова Юлия Владимировна,
к.б.н., доцент, доцент,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
✉ balakirevajulia3@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7534-7119>

Ахмадуллина Фарида Юнусовна,
старший преподаватель,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
akhmadullina1951@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6538-5616>

Сироткин Александр Семенович,
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Вклад авторов

Ю.В. Щербакова – проведение исследования, разработка методологии, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.
Ф.Ю. Ахмадуллина – разработка концепции, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.
А.С. Сироткин – курирование данных, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 11.04.2025.
Одобрена после рецензирования 07.08.2025.
Принята к публикации 19.08.2025.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Yulia V. Shcherbakova,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Associate Professor,
Kazan National Research
Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
✉ balakirevajulia3@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7534-7119>

Farida Yu. Akhmadullina,
Senior Lecturer,
Kazan National Research
Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
akhmadullina1951@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6538-5616>

Alexander S. Siroткин,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Department,
Kazan National Research
Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Contribution of the authors

Yulia V. Shcherbakova – investigation, methodology, writing – original draft, editing.
Farida Yu. Akhmadullina – conceptualization, writing – original draft, editing.
Aleksandr S. Sirotnik - data curation, writing – original draft, editing.

Conflict of interest

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

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

*The article was submitted 11.04.2025.
Approved after reviewing 07.08.2025.
Accepted for publication 19.08.2025.*