

МІНІСТЕРСТВО НАУКИ І ОСВІТИ УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

**КРУПИЦЬКА ЛАРИСА ОЛЕКСАНДРІВНА**



УДК [679.872+ 579.873. 1] : 57.083.1 : 546.33

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СИНБІОТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО  
АКТИВНИХ ДОБАВОК**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата технічних наук

Одеса – 2018

Дисертацією є кваліфіційна наукова праця на правах рукопису  
Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій  
Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник – доктор технічних наук, професор,  
лауреат Державної премії України  
**Капрельянц Леонід Вікторович**,  
Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра біохімії, мікробіології  
та фізіології харчування, завідувач кафедри

**Офіційні опоненти:** – доктор біологічних наук, професор  
**Кричковська Лідія Василівна**,  
Національний технічний університет  
«Харківський політехнічний інститут  
професор, кафедри органічного синтезу  
та нанотехнологій, завідувач кафедри;

– кандидат технічних наук, доцент  
**Ямборко Ганна Валентинівна**,  
Одеський національний університет  
ім. І.І. Мечникова,  
кафедра мікробіології, вірусології  
і біотехнології, доцент кафедри.

Захист відбудеться **«09» листопада 2018 року о 14:30** на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.02 Одеської національної академії харчових технологій (65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112, ауд А - 234).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської національної академії харчових технологій (м. Одеса, вул. Канатна, 112).

Автореферат розісланий «3 »жовтня 2018 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Г.В. Крусір

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Використання антибіотиків і різних фармацевтичних препаратів, вплив радіохвиль, хіміотерапії і ксенобіотиків їжі призводить до розвитку захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та інших органів і систем організму людини. Біологічні бактеріальні препарати добре зарекомендували себе у якості засобів профілактики і лікування дисбактеріозу ШКТ.

До недавнього часу на українському ринку були присутні тільки біфідо- та лактовмісні препарати-пробіотики. Сьогодні спектр полівидових препаратів розширюється. Слід відмітити, що незважаючи на багаточисленні експериментально підтвердженні імуномодельючі та біфідогенні властивості пропіоновокислих бактерій, недостатньо відомостей щодо їх використання при створенні препаратів-пробіотиків та продуктів пробіотичного призначення. Таким чином, актуальним завданням є розробка технології пробіотичних бактеріальних препаратів з різними комбінаціями таких культур, як біфідо- та пропіоновокислі бактерії, створення синбіотичних БАД.

Вагомий внесок у створення науково-практичних засад виробництва препаратів-пробіотиків та синбіотиків зробили вітчизняні та закордонні вчені: Коваленко Н. К., Пирог Т. П., Іваниця В. О., Капрельянц Л. В., Новіков В.П., Кігель Н. Ф., Шендеров Б. Я., Підгорський В. С.; Ісава К., Курама С., Шібасакі М., Ходжо К., Канеко Т., Йодо Н., Заратте М., Морі Х.

В останні роки окремо виділяється група метабіотиків (постбіотиків), яка містить продукти метаболізму чи структурні компоненти пробіотичних мікроорганізмів. Використання метабіотиків дозволяє створити керуємий мікробіоценоз кишківника, оскільки метаболічні сигнальні, транспортні та інші функції представників індигенної мікробіоти має більше значення, ніж кількісний вміст в біотопі мікроорганізмів тих чи інших мікроорганізмів тих чи інших видів.

Сьогодні тема метабіотиків розглядається в якості одного з перспективних напрямків розвитку пробіотиків, як новий клас постбіотиків. У зв'язку з цим особливо актуальною є розробка нових засбів для корекції дисбактеріозу ШКТ. Метабіотики в порівнянні з клітинною формою є більш безпечними, мають більш тривалий термін придатності до застосування, зменшують взаємодію з компонентами харчових продуктів.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана відповідно до держбюджетної тематики науково-дослідних робіт Одеської національної академії харчових технологій "Біотрансформація рослинної та мікробної сировини як метод отримання фізіологічно-функціональних харчових інгредієнтів дієтичних добавок".

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи є розробка технології виробництва синбіотичних біологічно активних добавок як на основі клітинної, так і безклітинної форм пробіотичних мікроорганізмів.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні завдання:

- відбір музейних культур кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування культур ОНАХТ:

- розробка складу поживного середовища для накопичення біомаси пробіотичних мікроорганізмів - біфідо- та пропіоновокислих бактерій;
- підбір умов та оптимізація технологічних режимів культивування комбінованої симбіотичної закваски;
- дослідження впливу пребіотиків на ріст та розвиток пробіотичних культур в монокультурі та в симбіотичному полівидовому консорціумі;
- дослідження складу метаболітів при культивуванні моно- та полівидових культур;
- розробка та обґрунтування технології виробництва синбіотичних БАД;
- дослідження основних змін показників якості БАД в процесі їх зберігання;
- розробка проекту нормативної документації на отримані препарати, розрахунок їх собівартості і економічної ефективності.

Об'єкти дослідження – культури мікроорганізмів, поживні середовища, біотехнології харчових продуктів і функціональних інгредієнтів.

Предмет дослідження – пребіотичні компоненти, структурні елементи метаболічної активності пробіотичних мікроорганізмів, біохімічні властивості мікроорганізмів, органолептичні, фізико-хімічні і мікробіологічні показники БАД як з нативними клітинами, так і з метаболітною безклітинною формою пробіотика..

Методи дослідження: комплекс сучасних та традиційних, органолептичних, біохімічних, фізико-хімічних, технологічних і мікробіологічних методів дослідження.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Теоретично обґрунтовано основні етапи досліджень і послідовність технологічних операцій для виробництва нових препаратів (безклітинний пробіотик, БАД з нативними клітинами і метаболітною безклітинною формою пробіотиків), які володіють комплексом біохімічних і виробничо-цінних властивостей, що дозволяє використовувати їх у складі моно- та полівидових бактеріальних препаратів та забезпечує можливість отримання безвідходного виробництва. Обрано оптимальні умови і визначено компонентний склад середовища для сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій, яке відрізняється вмістом соєвої сироватки у кількості 3%. Доведено, що безклітинний пробіотик включає 1,4-гідрокси-2-нафтоїнову кислоту, яка володіє біфідогенними ростовими властивостями з вираженим пребіотичним ефектом, що підтверджує доцільність застосування метаболітних пробіотиків для корекції дисбактеріозів і для підтримання балансу індигенної мікробіоти ШКТ людини.

Наукова новизна роботи підтверджена патентом України на корисну модель № 107738.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

Комплекс даних і закономірностей, які представлені у дисертаційній роботі, є основою для розробки технології виробництва полівидових бактеріальних препаратів у співвідношенні біфідо- та пропіоновокислих бактерій 1:1 з метою корекції та підтримання якісного та кількісного складу нормальної мікробіоти ШКТ. За результатами досліджень розроблено нормативно-технічну документацію (ТІ, ТУ). Промислову апробацію біологічно активних добавок проводили на підприємстві ТОВ НВО "Аріадна".

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Особисто автором були розроблені концепції біологічно активних добавок на основі метаболітного типу пробіотиків, а також синбіотиків з включенням як нативної форми пробіотика, так продуктів їх метаболітної діяльності. Виконана аналітична і експериментальна робота, проведено аналіз літературних та патентних даних, узагальнено отримані результати, сформульовані висновки і рекомендації, підготовлені матеріали досліджень у вигляді статей, тез та патенту. Розроблено нормативну документацію, проведено промислову апробацію розроблених технологій. Особистий внесок дисертанта підтверджується наданими документами і науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідались на 8 наукових конференціях, а саме: 75 науковій конференції науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2015); міжнародній науково-практичній конференції «Харчові технології, хлібопродукти і комбікорма» (Одеса, 2015); міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Харчові продукти та біотехнологія: сучасний стан і перспективи розвитку» (Полтава, 2015); міжнародній науково-практичній конференції «Оздоровчі харчові продукти дієтичні добавки: технологія, якість та безпека» (Київ, 2015); 76 науковій конференції науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2016); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії», присвячена до 100-річчя від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова (Львів, 2016), III-й конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 2017); 77 науковій конференції науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2017), 78 науковій конференції науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2018).

**Публікації.** Результати дисертації опубліковані у 19 друкованих працях, з них 5 наукових статей у наукових фахових виданнях ( серед них 1 стаття з індексуванням в наукометричній базі **Scopus**), 4 статті в інших наукових виданнях, 9 публікацій за матеріалами конференцій, один патент.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку літератури і додатків. Зміст роботи викладено на 144 сторінках, включаючи 26 таблиць (на 13 стор.), 29 рисунків (на 10 стор.), 14 додатків (на 104 стор.). Список використаних бібліографічних джерел містить 165 найменувань (на 15 стор.)

**Подяки.** Автор висловлює щире подяку кандидату технічних наук, доценту Труфкаті Л. В. за допомогу, цінні поради та сприяння при написанні роботи.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми досліджень, визначено наукову новизну та практичну цінність, сформульовано загальну мету та спрямованість роботи.

У **першому розділі** на базі аналізу літературних джерел дана характеристика про-, пре- и синбіотиків ринку України. Описано хімічну структуру метабіотикичних пробіотиків (постбіотиків) та механізм їх дії. Основою метабіотиків є культуральна рідина пробіотичних мікроорганізмів, що містить

продукти їх метаболізму. Визначено, що пробіотичні штами можуть продукувати різні набори низькомолекулярних біологічно активних речовин.

Дана загальна характеристика пробіотиків на прикладі пробіотичних культур біфідо- та пропіоновокислих бактерій, описано їх вплив на організм людини. Приведені дані щодо можливості пропіоновокислих бактерій синтезувати біфідогенні ростові фактори неуглеводної приподи з вираженою пребіотичною дією. Наведено схему механізму дії неуглеводного пребіотика на гліколітичні шляхи біфідобактерій.

**У другому розділі** викладено відомості про об'єкти і методи досліджень.

Основна частина досліджень була проведена в лабораторіях кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування ОНАХТ, окремі дослідження виконувалися на кафедрі екології та природоохоронних технологій ОНАХТ; на базі фізико-хімічного інституту імені А.В. Богатського НАН України та в Одеському селекційно-генетичному інституті.

Об'єктами досліджень у даній дисертаційній роботі були культури з музею кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування ОНАХТ: *Bifidobacterium longum* - ЯЗ, *Bifidobacterium adolescentis* - С52, *Bifidobacterium bifidum* - 1, *Propionibacterium shermanii* - 4. Культивування проводили на лактозному середовищі з додаванням соєвої сироватки.

**У третьому розділі** наведено результати експериментальних досліджень, пов'язане з одержанням синбіотичних біологічно активних добавок і біфідогенного стимулятора, що продукують пропіоновокислі бактерії.

Проведено підбір середовища культивування. Розроблено соєво-лактозне середовище для культивування біфідобактерій. Для визначення найбільш підходящої концентрації соєвої сироватки в лактозному поживному середовищі вивчали динаміку росту бактерій роду *Bifidobacterium* на середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки, %: 1, 2, 3, 4, 5, 6. У якості контролю використовували кукурудзяно-лактозне середовище.

Всі досліди проводили не менше ніж у трьох повторностях, математичну обробку результатів здійснювали за загальноприйнятими статистичними методами.

На рис. 1 відображено вплив різної масової частки соєвої сироватки на динаміку росту *Bifidobacterium longum* - ЯЗ.

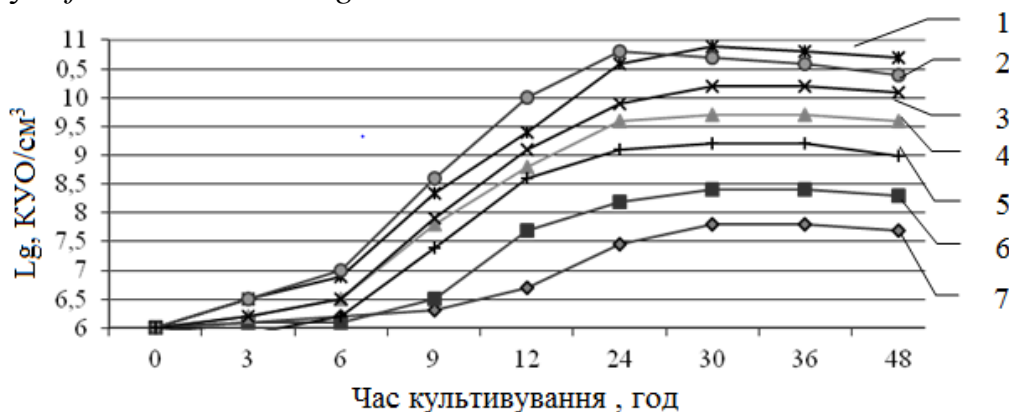


Рис. 1. Динаміка росту *B. longum*-ЯЗ на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки у кількості:  
1 – 6%; 2 – 5%; 3 – 4%; 4 – 3%; 5 – контроль; 6 – 2%; 7 – 1%.

*B. longum* - ЯЗ був найбільш чутливим до зміни кількості ростового фактора рослинного походження, тому було доцільно дослідити вплив різних доз соєвої сироватки на питому швидкість росту, тривалість генерації та продуктивність біотехнологічного процесу (таб. 1). За даними тривалості генерації визначали час, який пройшов між двома поділами бактеріальних кліти.

Таблиця 1

**Зміна показників питомої швидкості росту і тривалості генерації при культивуванні *B. longum*-ЯЗ на лактозному поживному середовищі з додаванням соєвої сироватки.**

Час культивування, год	Кількість соєвої сироватки, %						
	0	1	2	3	4	5	6
	Питома швидкість росту, год <sup>-1</sup>						
1	2	3	4	5	6	7	8
0-3	0,210	0,250	0,240	0,22	0,21	0,20	0,21
0-6	0,100	0,140	0,120	0,12	0,12	0,131	0,132
0-9	0,080	0,090	0,090	0,10	0,10	0,098	0,10
0-12	0,070	0,070	0,080	0,07	0,083	0,082	0,083
0-24	0,040	0,040	0,040	0,040	0,041	0,044	0,045
0-30	0,030	0,033	0,031	0,03	0,030	0,036	0,036
0-36	0,25	0,032	0,027	0,028	0,028	0,030	0,029
0-48	0,018	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
	Тривалість генерації, год <sup>1</sup>						
0-3	3,2	2,7	2,8	3,1	2,8	3,4	3,1
0-6	6,8	4,9	5,7	5,7	5,7	5,2	5,1
0-9	8,5	7,5	7,5	6,8	6,8	7	6,8
0-12	9,7	9,7	8,5	9,7	9,7	8,3	9,7
0-24	17,1	17,1	17,1	17,1	16,6	15,5	15,2
0-30	22,7	20,7	22,0	22,7	22,7	18,9	18,9
0-36	27,3	21,3	25,3	24,4	24,4	22,7	23,5
0-48	37,8	34,1	34,1	34,1	34,1	34,1	34,1

Максимальні значення питомої швидкості росту спостерігали протягом перших 6-12 годин інкубації. Отримані дані підтвердженні максимальною кількістю життєздатних клітин біфідобактерій у всіх дослідних зразках, що можна пояснити активним накопиченням біомаси *B. longum* - ЯЗ.

Зі збільшенням кількості масової частки соєвої сироватки у поживному середовищі спостерігали збільшення показників питомої швидкості росту, у порівнянні з найменшою кількістю стимулятора росту, а саме 1% соєвої сироватки, що свідчить про інтенсивний приріст біомаси за умов збільшення масової частки рослинного стимулятора росту у поживному середовищі.

Продуктивність біотехнологічного процесу визначається кількістю цільового продукту, який отримують з одиниці об'єму культуральної рідини за одиницю часу (рис 2).

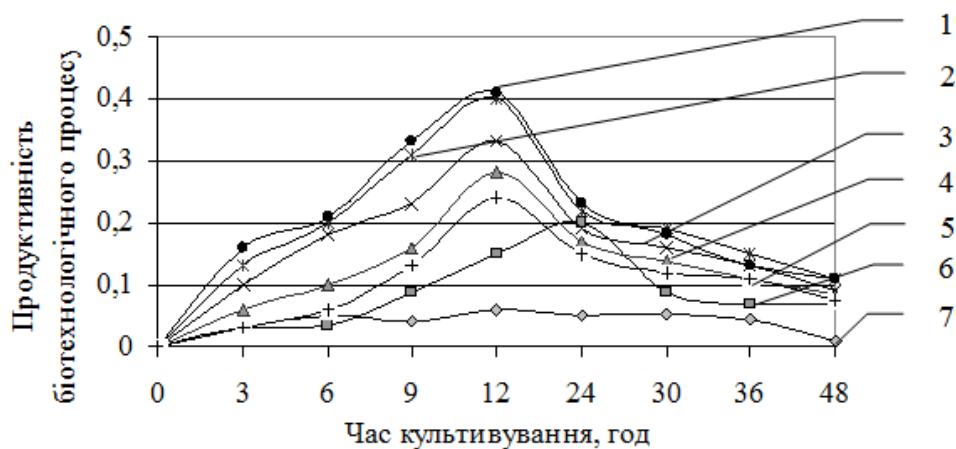


Рис. 2. Продуктивність біотехнологічного процесу за різної масової частки соєвої сироватки у кількості:  
1 – 6%; 2 – 5 %; 3 – 4 %; 4 – 3%; 5 – контроль; 6 – 2%; 7 – 1 %

За результатами експериментальних даних було визначено, що зі збільшенням кількості соєвої сироватки кількість цільового продукту збільшувалась. При збільшенні соєвої сироватки до 6 % показники продуктивності підвищувались, проте дуже швидко зазнавали спад і навіть були нижчими, ніж показники продуктивності культивування у поживному середовищі із додаванням 5% масової частки соєвої сироватки.

За показниками оптичної густини, КУО/см<sup>3</sup>, питомої швидкості росту, тривалості генерації, активної та титрованої кислотності встановлено, що раціональною кількістю рослинного стимулятора росту у середовищі культивуванні є 3 % соєвої сироватки від загального об'єму середовища культивування.

У роботі, окрім біфідобактерій, проводили експериментальні дослідження з використанням штаму *Propionibacterium shermanii* - 4.

Відомим середовищем культивування для пропіоновокислих бактерій є середовище на основі сирної сироватки (СПК): 1л сирної сироватки, 0,3 г/л хлористого магнію, 1,0 г/л лимоннокислого натрію тризаміщеного, 0,5 г/л фосфорнокислого калію однозаміщеного, 0,1 г/л аскорбінової кислоти, 1,3 г/л агар-агару.

Сирна сироватка багата на лактозу, яка є спільним компонентом соєволактозного середовища для культивування біфідобактерій. За допомогою рефрактометра було визначено, що у 100 мл сирної сироватки містилось сухих речовин у кількості 5 г/л. З урахуванням цих експериментальних даних, економічної та технологічної доцільності, було запропоновано для збереження пропорції вмісту всіх компонентів соєволактозного середовища замінити 10 г сухої лактози на сирну сироватку у кількості 200 мл.

Критерієм вибору температурного режиму для сумісного культивування пропіоновокислих та біфідобактерій було порівняння динаміки накопичення

кількості клітин пробіотичних мікроорганізмів за різних температур. Відомо, що температурний оптимум для пропіоновокислих бактерій дорівнює  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ , а для біфідобактерій –  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , тому ці точки були обрані нами як граничні. Накопичення біомаси зазначеними культурами за оптимальних температур слугувало контролем.

Зміна оптимальних температур культивування бактерій призводила до зниження приросту їх біомаси. У той час як за проміжної температури  $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$  спостерігали рівномірний розвиток пробіотичних мікроорганізмів. Показники накопичення біомаси пропіоновокислих і біфідобактерій при даній температурі були приблизно однаковими та становили не менше  $10^9$  КУО/см<sup>3</sup> (рис. 3).

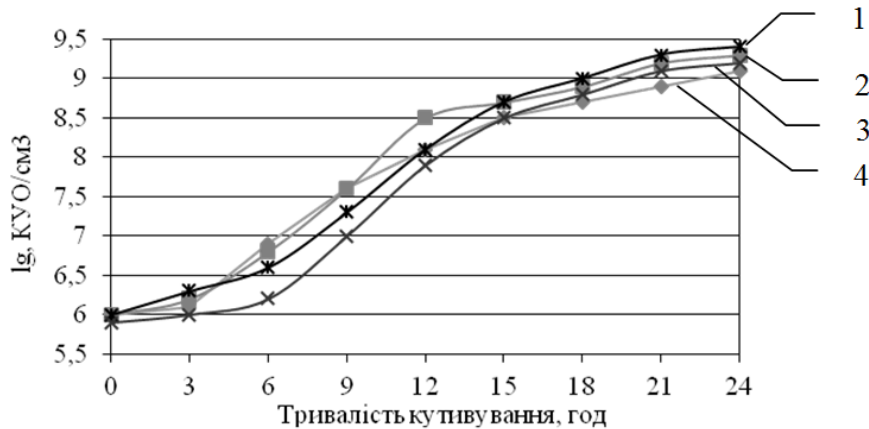


Рис. 3. Динаміка росту пробіотичних культур за температури  $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$ :  
1 – *B. longum* - ЯЗ; 2 – *B. bifidum* - 1; 3 – *B. adolescentis* - С52; 4 – *P. shermanii* - 4

Подальше сумісне культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій проводили з метою визначення оптимального варіанту внесення бактерій.

Найбільш інтенсивний ріст біфідобактерій спостерігали у першій лінії експерименту – за одночасного внесення культур *B. bifidum* -  $1 - 2 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. adolescentis* - С52 –  $1 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, *B. longum* - ЯЗ –  $3 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>.

За умов внесення пропіоновокислих бактерій після 5 годин попереднього культивування біфідобактерій спостерігали незначне зниження приросту біомаси на початку логарифмічної фази порівняно з першою лінією експерименту. Проте вже на 24 годину культивування кількість біомаси комбінованої закваски в першій та другій лінії була однаковою і склала  $4-5 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>.

За результатами досліджень визначено, що одночасне внесення бактеріальних інокулятів у співвідношенні 1:1 за проміжної температури  $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$  було найбільш вдалим для росту та накопичення біомаси пробіотичними культурами.

Щільність популяції пробіотичних мікроорганізмів в консорціумі була більшою, ніж у монокультурі і збільшувалась з  $10^9$  КУО/см<sup>3</sup> до  $10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, що говорить про симбіотичні зв'язки біфідо- та пропіоновокислих бактерій (таб 2).

Одержані результати експерименту свідчать про можливість сумісного культивування бактерій родів *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* за температури  $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 24 годин. Незалежно від способу внесення інокулятів біфідо- та пропіоновокислих бактерій, за 24 години культивування накопичувалась майже

однакова кількість біомаси, проте за одночасного внесення спостерігали дещо швидший приріст у логарифмічній фазі.

Таблиця 2

**Показники розвитку бактерій родів *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* в монокультури та у консорціумі за одночасного внесення після 24 годин культивування**

(n=3, P ≤ 0,95)

Показники	У монокультури				У консорціумі бактерій у співвідношенні 1:1			
	<i>B. longum</i> - Я3	<i>B. bifidum</i> - 1	<i>B. adolescentis</i> - C52	<i>P. shermanii</i> - 4	<i>B. longum</i> - Я3 + <i>P. shermanii</i> - 4	<i>B. bifidum</i> - 1 + <i>P. shermanii</i> - 4	<i>B. adolescentis</i> - C52 + <i>P. shermanii</i> - 4	
Кількість клітин біфідобактерій, КУО/см <sup>3</sup>	4·10 <sup>9</sup>	3·10 <sup>9</sup>	2·10 <sup>9</sup>	–	3·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>10</sup>	1·10 <sup>10</sup>	
Кількість клітин пропіоновокислих бактерій, КУО/см <sup>3</sup>	–	–	–	1·10 <sup>9</sup>	4·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>10</sup>	
Активна кислотність, рН	4,7	4,7	4,9	5,9	5,3	5,3	5,4	
Титрована кислотність, °Т	64	62	59	70	74	73	71	

З розвитком промислового ринку БАД з вмістом поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) з'явилася потреба в пошуку нових джерел. Перспективним джерелом ліпідів, а саме ПНЖК, є мікроорганізми. Мікроорганізми здатні швидко накопичувати біомасу на простих середовищах. При цьому вони синтезують і накопичують в клітинах до 50 % ПНЖК.

Завдяки високоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) вивчали вміст жирних кислот (ЖК) експериментальних зразків. Контролем був зразок середовища культивування без пробіотичних культур.

За результатами експериментальних даних виявлено, що практично у всіх зразках основними були пальмітинова та олеїнова ЖК. Найціннішим складом ЖК характеризувалась закваска симбіотичного консорціуму *B. longum* - Я3 і *P. shermanii* - 4. В даному зразку сума ненасичених жирних кислот (78,36 %), була вищою, ніж в інших дослідних зразках. Кількість лінолевої кислоти становило 23,99 %.

Відмічено, що пробіотична закваска консорціуму *B. longum* - Я3 і *P. shermanii* - 4 характеризувалася найвищими показниками біохімічної активності, тому її обрано для наступних досліджень.

Для створення синбіотиків зазвичай використовують біфідо- і лактобактерії в поєднанні з відомими пребіотиками, як лактулоза і інулін. В наш час достатньо фактичних даних про наявність пробіотичних властивостей у пропіоновокислих

бактерій, але дослідження впливу пребіотиків на ріст чистої культури *P. shermanii* та в консорціумі з біфідобактеріями не проводилися.

На рис. 4 відображено вплив пребіотиків на динаміку росту *P. shermanii* - 4. Результати експериментальних даних порівнювали з результатами приросту біомаси *P. shermanii* - 4 на соєволактозному середовищі без додавання пребіотиків.

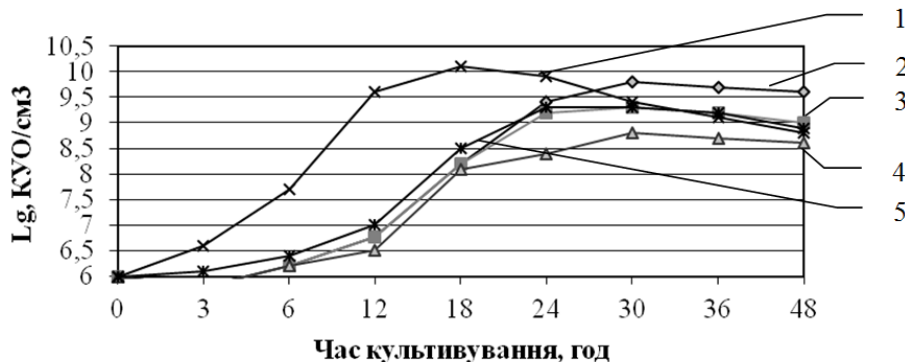


Рис. 4. Вплив пребіотиків на динаміку росту *P. shermanii* - 4: 1 – лактоза 2 %; 2 – інулін 1 %; 3 – інулін 2 %; 4 – інулін – 3 %; 5 – контроль

За результатами експериментальної роботи було визначено позитивний ефект на приріст пропіоновокислих бактерій лактулози та інуліну в кількості 2% і 1% відповідно.

Однак в консорціумі бактерій родів *Bifidobacterium* і *Propionibacterium* вказана кількість вищезазначених пребіотиків дещо гальмувала приріст біомаси пропіоновокислих бактерій. Це можна пояснити наявністю у складі поживного середовища соєвої сироватки з вираженими пребіотичними властивостями, що створювала додаткове антигенне навантаження. Тому для створення синбіотичної біологічної добавки в якості пробіотиків використовували штами *B. longum* - ЯЗ і *P. shermanii* - 4, а соєва сироватка грала роль пребіотика.

Наступним етапом досліджень було вивчення впливу метаболітів супернатанту *P. shermanii* - 4 на приріст біомаси *B. bifidum* - 1. Контролем був зразок без додавання супернатанту. Виявлено, що у всіх експериментальних зразках після культивування при  $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$  протягом 24 годин на соєволактозному середовищі з додаванням різної кількості супернатанту *P. shermanii* - 4 спостерігався позитивний вплив на збільшення біомаси *B. bifidum* - 1. Зі збільшенням кількості фільтрату, збільшувалась кількість життєздатних клітин біфідобактерій (таб. 3).

Таблиця 3

### Вплив вторинних метаболітів *P.shermanii* - 4 на ріст *B. bifidum* - 1

(n=3, P $\geq$ 0,95)

№ зразка	Співвідношення інокуляту біомаси <i>B. bifidum</i> - 1 до супернатанту <i>P.shermanii</i> - 4	Кількість життєздатних клітин <i>B. bifidum</i> - 1, КУО/см <sup>3</sup> .
1	1:1	$3 \cdot 10^9$
2	1:1,5	$5 \cdot 10^9$
3	1:2	$9 \cdot 10^9$
4	1:2,5	$1 \cdot 10^{10}$
5	1:3	$2 \cdot 10^{10}$
Контроль	1:0	$1 \cdot 10^9$

За результатами мікробіологічних досліджень, рекомендовано використовувати фільтрат *P. shermanii* - 4 у кількості від 2 % до 3%, як стимулятор росту біфідобактерій.

Для дослідження антагоністичної активності супернатанту культуральної рідини *P. shermanii* - 4 щодо патогенних та умовно патогенних штамів використовували супернатант у кількості 2 %, 2,5 % та 3 %, що обумовлено результатами попередніх експериментів (таб. 4).

Найбільшу чутливість до вторинних метаболітів *P. shermanii* - 4. виявлено у *Bacillus cereus* - ATCC11778 та *Staphylococcus aureus* - ОНУ223. Було встановлено, що штам *Salmonella enteritidis* - ОНУ466 був стійкими до впливу супернатанта пропіоновокислих бактерій.

Біфідогенна активність пропіоновокислих бактерій зумовлюється продукуванням 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти (DHNA), 2-аміно-3-карбокси-1,4-нафтохінону (ACNQ). DHNA є більш активним стимулятором росту біфідобактерій, ніж ACNQ.

Таблиця 4

**Антимікробна активність супернатанту культуральної рідини  
*P. shermanii* - 4.**

(n=3, P≥0,95)

Кількість супернатанту, %	Зони пригнічення росту тест-культур, мм			
	<i>Bacillus cereus</i> - ATCC11778	<i>Staphylococcus aureus</i> - ОНУ223	<i>Escherichia coli</i> - ATCC25922	<i>Salmonella enteritidis</i> ОНУ262
2	13±0,5	16±0,5	9±1	-
2,5	15±1	16±1	10±0,5	-
3	16±1	17±1	12±1	2±1

Біфідогенний стимулятор росту за своєю хімічною будовою можна віднести до пребіотичних речовин неуглеводної природи, які при низьких концентраціях (0,5 нМ) активно приймають участь в процесах субстратного фосфорилування з утворенням енергії у клітинах біфідобактерій.

Шлях метаболізму біфідобактерій (енергетичний метаболізм) і ймовірний механізм участі в ньому біфідогенних ростових стимуляторів представлений на рис. 5

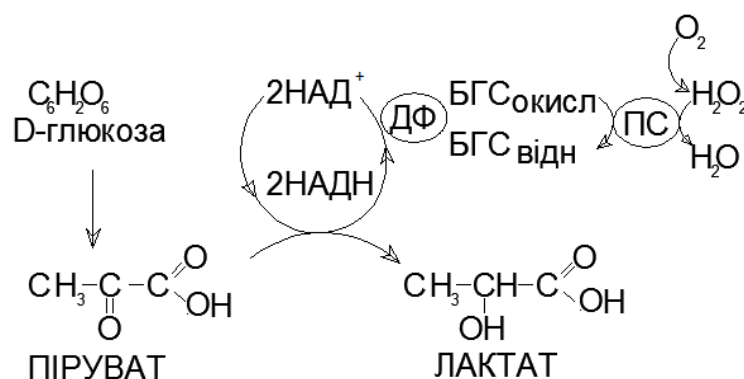


Рис. 5. Шлях метаболізму біфідобактерій і ймовірний механізм участі в ньому біфідогенних ростових стимуляторів:

ДФ – діафороза, ПС- пероксидаза.

Найважливішими функціями біфідогенного стимулятора (БГС) є можливість проникнення через мембрану клітини в цитозоль біфідобактерій для здійснення функції електронного акцептора за участі фермента діафори (ДФ) – цитозольний гомодимерний флавопротеїн. Діафораза приймає участь у низці біохімічних реакцій клітини. Найважливішою, з яких є одноступеневе двуелектронне відновлення хінонів до гідрохінонів.

Запропонована схема впливу БГС на катаболізм глюкози у біфідобактерій у якості переносника електронів дозволяє підсумувати, що БГС може проникати у цитозоль клітини біфідобактерій і відновлюватися діофорою чи іншими відповідними ферментами НАД<sup>+</sup>.

Відновленому біфідогенному стимулятору (БГС<sub>віднов</sub>) важко проникнути через мембрану назовні через її високу гідрофільність. В цитозолі БГС<sub>окисл</sub> відновлюється шляхом автоокислення з утворенням перекису водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), який також окислюється БГС<sub>віднов</sub> пероксидазою (ПС).

Особливості запропонованого механізму участі БГС при катаболізмі біфідобактерій полягає у наступному:

- НАД<sup>+</sup> система відновлюється у клітині без споживання пірувата;
- можливі цитотоксичні ефекти активних форм кисню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), які утворюються шляхом аутоокислення можуть бути мінімізовані реакціями за участі ферментів пероксидаз
- незначна кількість БГС здатна здійснювати стимулюючу дію на приріст біомаси біфідобактерій шляхом накоплення енергії у клітинах, оскільки акумулюється в них як медіатор.

Всі ці особливості пояснюють біфідогенну активність БГС для біфідобактерій.

За допомогою ВЕРХ визначено, що у супернатанті монокультури пропіоновокислих бактерій після концентрації із вмістом 19,1...20,3 % сухих речовин містилось 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнова кислота у кількості 6,7 мг/л (рис. 6).

Отримані експериментальні дані свідчать про доцільність застосування супернатанта культуральної рідини *P. shermanii* - 4 як для створення пробіотика метаболітного типу, так і для конструювання поліштамового синбіотика, використовуючи DHNA у якості пребіотика неуглеводної природи.

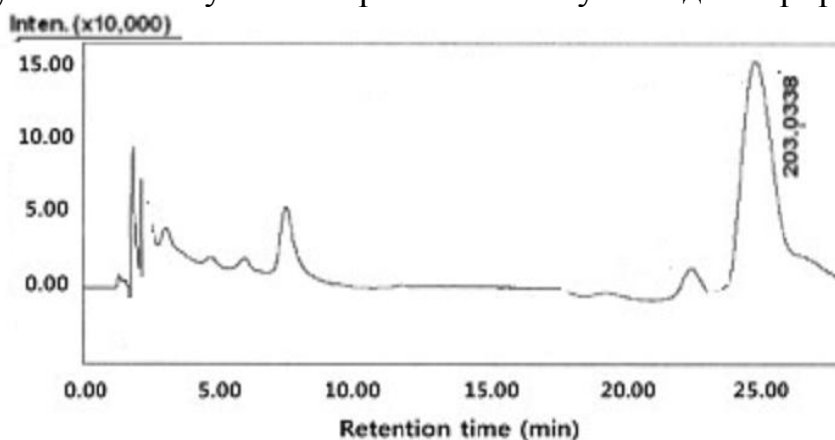


Рис. 6. ВЕРХ 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти в супернатанті монокультури *P. shermanii* - 4

Одним із подальших етапів досліджень була перевірка життєздатності біфідо- та пропіоновокислих бактерій в умовах *in vitro*, які моделюють ШКТ людини.

На початку експозиції кількість життєздатних клітин монокультур біфідо- та пропіоновокислих бактерій становила не менше  $1 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, а в консорціумі – не менше  $1 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, то зниження кількості життєздатних бактерій порівнювали з початковими показниками.

Результати здатності пробіотиків до виживання як в монокультурі, так і у консорціумі біфідо- та пропіоновокислих бактерій оцінювали на початку експерименту (0 год), через 4 год інкубації в кислому середовищі (рН = 2,0) і через 12 год інкубації в лужному середовищі (рН = 7,2). Результати експериментальних даних представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

**Резистентність пробіотичних культур за несприятливих умов шлунково-кишкового тракту**

(n=3, P≥0,95)

Пробіотична культура	Вміст живих бактерій у зразку, КУО/см <sup>3</sup>		
	0 год	4 год	12 год
Монокультура <i>B. longum</i> - ЯЗ	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^5$
<i>B. longum</i> - ЯЗ в консорціумі	$4 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^7$
Монокультура <i>P. shermanii</i> - 4	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^5$
<i>P. shermanii</i> - 4 в консорціумі	$3 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^7$

З представлених даних видно, що здатність до виживання пробіотиків після інкубації мікроорганізмів послідовно в кислому і лужному модельних середовищах при температурі 37°C протягом середнього часу перебування змішаної їжі відповідно в шлунку і кишечнику людини залежала від симбіотичних зв'язків пробіотичних бактерій. В результаті впливу на пробіотичні мікроорганізми факторів, що імітують умови в шлунково-кишковому тракті людини, відбувалося помітне зниження кількості життєздатних мікробних клітин. У кислому середовищі число життєздатних мікроорганізмів у монокультурі знижувалося на два порядки в порівнянні з початковим числом, а в консорціумі бактерій на один порядок, і в лужному середовищі – ще два порядки.

Таким чином, в процесі дослідів *in vitro* кількість мікроорганізмів, що вижили у консорціумі достатня для адгезії та фіксації в умовах кишківника і становила не менше  $1 \cdot 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>. Також було встановлено дещо вищу резистентність як біфідо- так і пропіоновокислих бактерій в складі консорціуму, ніж в монокультурі, що можна пояснити синтезованими метаболітами, які створюють захисний бар'єр від агресивного середовища шлунково-кишкового тракту.

У четвертому розділі наведено результати оптимізації умов для сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій, наведено принципи технологічні схеми виробництва синбіотика та метабіотика; наведено результати медико-біологічних досліджень їх безпеки.

Показники активної кислотності дають змогу визначити інтенсивність та швидкість розвитку біомаси бактерій та накопичення їх метаболітів у середовищі культивування. Основними метаболітами, що створюють реакцію середовища у ході культивування є молочна, пропіонова, оцтова кислоти.

Оптимізацію умов культивування проводили з метою отримання максимального виходу біомаси біфідо- і пропіоновокислих бактерій та створети на їх основі біологічно активної добавки.

Найбільший вихід біомаси в процесі культивування відноситься до етапу активного розмноження клітин бактерій *B. longum*-ЯЗ та *P. shermanii*-4 ( $8 \leq t < 25$  годин). Тобто цільова функція визначалася наступним кінетичним рівнянням:

$$B = a + \frac{bc}{d-c} (e^{-ct} - e^{-dt}) \quad (1.1)$$

$$\begin{aligned} \text{де } a &= 0,09113 \cdot T^2 - 5,942 \cdot T + 95,17, \\ b &= -0,4248 \cdot T^2 - 28,31 \cdot T + 456,3, \\ c &= 0,003615 \cdot T^2 - 0,2446 \cdot T + 4,25, \\ d &= 0,000642 \cdot T^2 - 0,042855 \cdot T + 0,7067. \end{aligned}$$

Розглянемо графік цієї функції  $B = B(t, T)$ , який будували за допомогою системи комп'ютерної математики MATLAB (рис. 7).

З графіку видно, що поверхня  $B = B(t, T)$  має максимум для деяких значень часу ( $t$ ) та температури ( $T$ ). Для визначення максимуму функції  $B = B(t, T)$  використовували задачу нелінійного програмування, яку вирішували також в системі MATLAB. Отже найбільше значення виходу біомаси консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій є величина  $B = 10,75$  КУО/см<sup>3</sup>, яка відповідає часу  $t = 24$  год за температури  $T = 33,74$  °С.

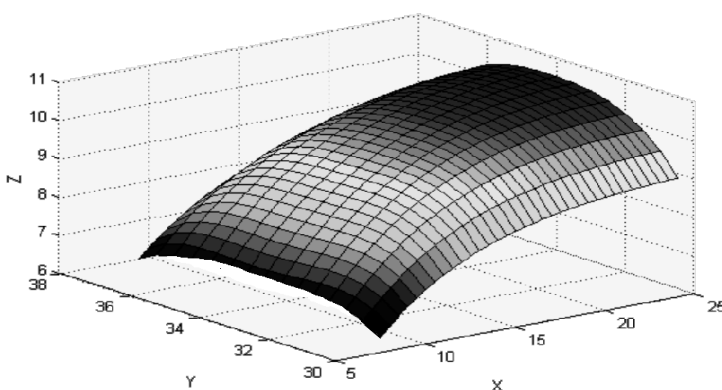


Рис. 7. Графік meshgrin- функції: зміна КУО/см<sup>3</sup> консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій за різних температур:  $x$  - час культивування, год;  $y$  - температура культивування, °С;  $z$  - кількість життєздатних клітин, КУО/см<sup>3</sup>.

За результатами експериментальної роботи з оптимізації процесу культивування була розроблена технологія виробництва симбіотичної біологічно активної добавки (рис. 8).

У попередніх експериментальних дослідженнях було розроблено соєво-лактозне поживне середовище для сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій. З метою запобігання присутності сторонньої мікробіоти проводили процес стерилізації при 1 атм протягом 30 хвилин з послідуєчим

охолодженням до температури заквашування симбіотичного консорціуму *B. longum* - Я3 та *P. shermanii* - 4, а саме, 34 °С. Ферментер заповнюють поживним середовищем, а потім одночасно засівають культури другої генерації *B. longum* - Я3 та *P. shermanii* - 4 у співвідношенні 1:1 в рівних об'ємах у кількості 5% від загального об'єму середовища культивування. Процес культивування проводили протягом 24 годин за температури 34 °С.

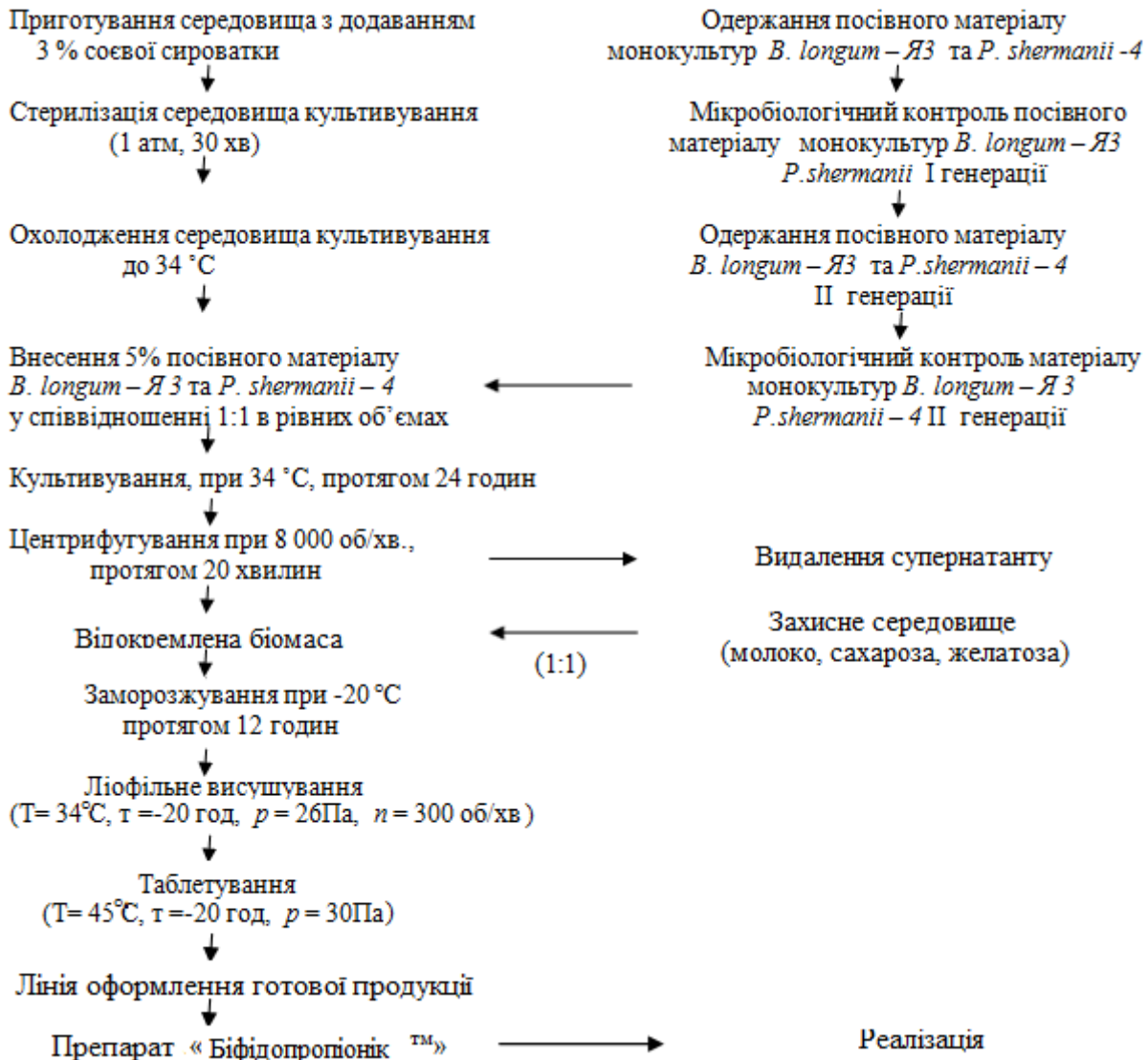


Рис.8. Принципова технологічна схема отримання симбіотичної біологічно активної добавки «Біфідопропіонік™»

Після отримання максимальної кількості біомаси консорціуму бактерій *B. longum* - Я3 та *P. shermanii* - 4 проводили відділення мікроорганізмів від культуральної рідини за допомогою центрифугування при 8 000 об/хв. протягом 20 хвилин .

Отриману очищену біомасу консорціуму бактерій *B. longum* - Я3 та *P. shermanii* - 4 ресуспендували захисним середовищем (що містило наступні компоненти, %: сахарозу – 50, желатозу – 25, молоко – 25), у співвідношенні 1:1. подальшим ліофільним висушуванням.

Таким чином, була розроблена технологія отримання біологічно активної добавки на основі симбіотичного консорціуму.

Відділення культуральна рідина консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій, що містить продукти метаболізму слугувала сировиною для виробництва метабіотика (рис. 9).

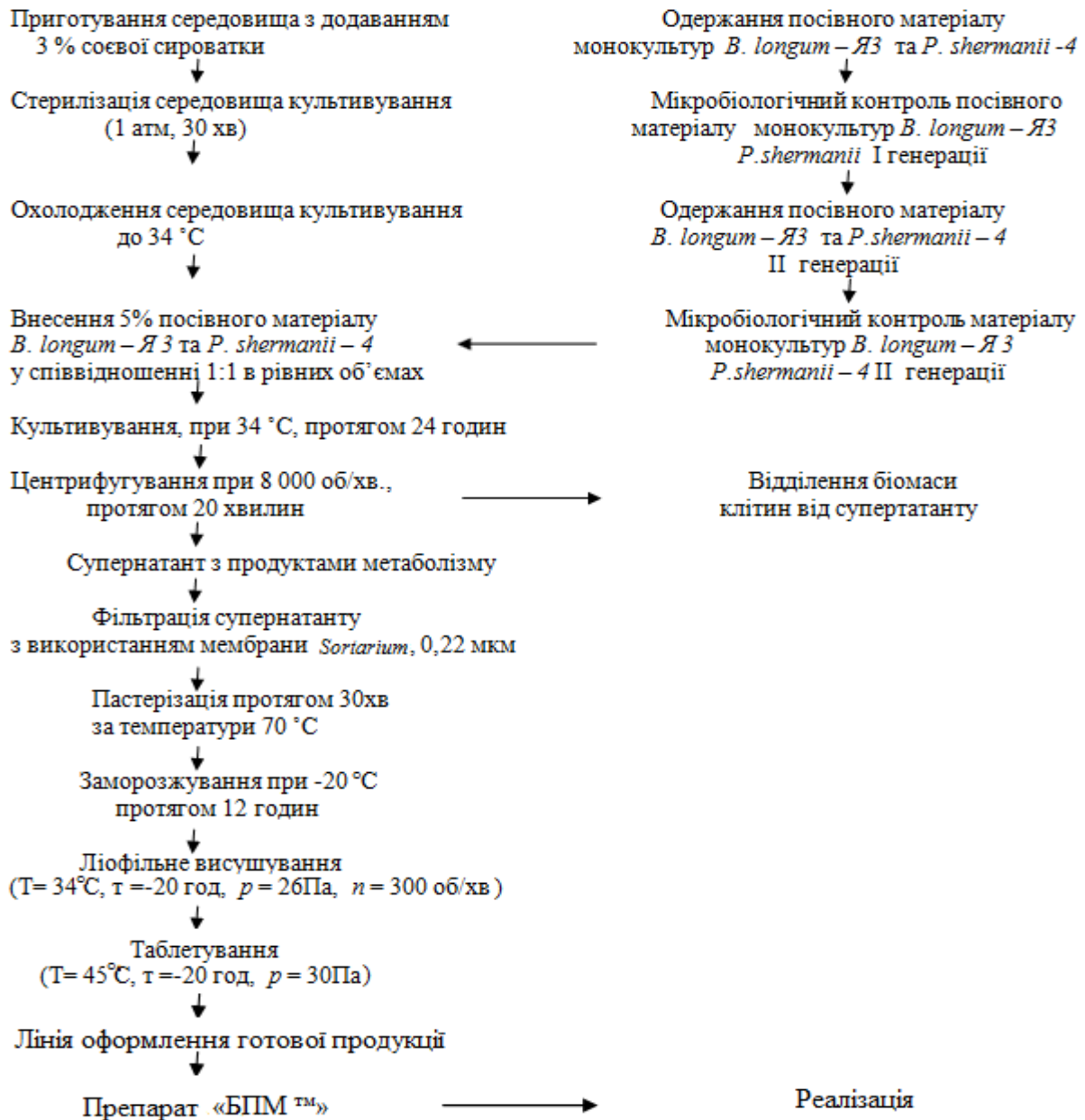


Рис. 9. Принципова схема отримання метабіотика «БПМ™»

Отриманий супернатант пастеризували за температури 70 °С протягом 30 хвилин. Висушування суміші проводили із попереднім заморожуванням, яке проводили за температури -20 °С протягом 12 годин. Через 8 годин від початку заморозки температуру знижували до -30 °С. Для отримання сухого порошкоподібного продукту із залишком вологи 5%, сублімацію проводять протягом 20-24 годин з подальшим таблетуванням суміші.

Препарат «Бігестім™» отримували за технологічними етапами виробництва, які аналогічні рис. 9.

Промислову апробацію розробленої технології виробництва синбіотичних біологічно активних добавок проводили на базі ТОВ НПО «Аріадна» в м. Одесі. В ході промислової апробації були виготовлені дослідні партії по 1000 г наступних функціональних інгредієнтів, які отримали такі торгові назви: «Біфідопропіонік™» (ТУ У 24.14-02071062-001:2017 та ТІ) – на основі пробіотичних культур; «БПМ™» (ТУ У 24.14-02071062-002:2017 та ТІ) – на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму *Bifidobacterium longum* - ЯЗ *Propionibacterium shermanii* - 4; «Бігестім™» (ТУ У 24.14-02071062-003:2017 та ТІ) – на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму пробіотичної культури *Propionibacterium shermanii* - 4).

Органолептична та фізико-хімічна характеристика отриманих препаратів представлена в таблиці 4.

Таблиця 4

## Органолептичні показники розроблених препаратів

Препарат «Біфідопропіонік™»	
Показник	Характеристика
Зовнішній вигляд	Порошок з кристалічною чи пористою масою
Смак та запах	Специфічний
Колір	Бежевий
Кільсний вміст 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти мг/л	4,0±1
Препарат «БПМ»	
Зовнішній вигляд	Порошок з кристалічною чи пористою масою
Смак та запах	Специфічний
Колір	Бежевий
Кільсний вміст 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти мг/л	4,0±1
Препарат «Бігестім™»	
Зовнішній вигляд	Порошок з кристалічною чи пористою масою
Смак та запах	Специфічний
Колір	Бежевий
Кільсний вміст 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти мг/л	6,7±1

Препарат «Біфідопропіонік™» містить  $7 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, з них *B. longum* - ЯЗ –  $4 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup> *P. shermanii* - 4 –  $3 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>.

Протягом 12 місяців зберігання визначали мікробіологічні показники «Біфідопропіонік™». В процесі зберігання за температурного режиму +2..+6 °С показники кількості життєздатних клітин поступово знижувалися и вже на при кінці 12 місяця сягали  $3 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>, а при кінці 18 місяця кількість клітин становила  $1,8 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>. Однак навіть найнижчі експериментальні показники колоніє утворюючих клітин забезпечували пробіотичну дозу.

Перевірка безпеки препаратів «Біфідопропіонік™», «БПМ™», «Бігестім™» проводилась в експериментальних умовах на лабораторних тваринах, а саме безпородних білих мишах. Лабораторних тварин було розділено на 5 груп (по 10 голів в кожній). Першій групі до стандартного раціону додавали препарат «Біфідопропіонік™»; другій – препарат «БПМ™»; третій – препарат «Бігестім™»; четверта та п'ята групи були контрольними.

В процесі дослідження було виявлено, що в дослідних групах мишей, як і у контрольних групах шерстяний покрив тварин був сухим, блискучим, видимі слизові – блідо-рожеві. В ході експерименту не було виявлено статистично значущих змін маси тіла мишей дослідних груп у порівнянні з контролем. Після аналізу фекалій дослідних груп тварин встановлено підвищений вміст клітин біфідобактерій в середньому в 2 рази, що свідчить про ефективність дії біологічно активних добавок, а в першій дослідній групі були виявлені клітини бактерій роду *Propionibacterium*.

Собівартість отриманих функціональних інгредієнтів для препарату «Біфідопропіонік™» становить 50,73 грн; для препарату «БПМ™» – 30,73 грн; для препарату «Бігестім™» – 30,73 грн.

## ВИСНОВКИ

На підставі проведених теоретичних та експериментальних досліджень розроблено біотехнології отримання синбіотичної пробіотичної добавки та нового біфідогенного стимулятора – метабіотика.

1. Обґрунтовано доцільне використання культур *B. longum* - ЯЗ та *P. shermanii* - 4 з високою біохічною активністю та антагоністичними властивостями для виробництва синбіотичних біологічно активних добавок.

2. Експериментально доведено позитивний вплив зростаючих концентрацій соєвої сироватки на приріст біомаси біфідобактерій. Встановлено раціональний вміст соєвої сироватки у поживному середовищі у кількості 3 % від загального об'єму середовища культивування, що стало підґрунтям для розробки соєво-лактозного середовища для сумісного культивування *Propionibacterium shermanii* - 4 та бактерій роду *Bifidobacterium*.

3. Встановлені раціональні умови сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій. Найбільше накопичення біомаси консорциуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій склало  $10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup> за одночасного внесення бактеріальних інокулятів у співвідношенні 1:1 та наступним культивуванням на соєво-лактозному середовищі протягом 24 годин за температури 34 °С.

4. Досліджено позитивний вплив пребіотиків лактулози у кількості 2 % та інуліну в кількості 1 % на динаміку росту *P. shermanii* - 4. Виявлено, що в консорціумі бактерій родів *Bifidobacterium* і *Propionibacterium* вказана кількість вищезазначених пребіотиків дещо гальмувала приріст біомаси пропіоновокислих бактерій оскільки у складі поживного середовища була присутня соєва сироватка з вираженими пребіотичними властивостями, що створювала додаткове антигенне навантаження. Для створення синбіотичної біологічної добавки у якості пребіотика використовували соєву сироватку у кількості 3 %.

5. Визначено, що пробіотичний комплекс з включенням *P. shermanii* - 4 є активним продуцентом ліпідів. За допомогою ВЕРХ встановлено, що у заквасці симбіотичного консорціуму *B. longum* - ЯЗ і *P. shermanii* - 4 сума ненасичених жирних кислот (78,36%), була вищою, ніж в інших досліджуваних зразках. Кількість лінолевої кислоти становило 23,99%. Доведена здатність супернатанту *P. shermanii* - 4 проявляти антагоністичну активність проти умовнопатогенної мікробіоти. Найбільшу чутливість до вторинних метаболітів *P. shermanii* - 4 виявлено у *Bacillus cereus* - ATCC11778 та *Staphylococcus aureus* - ОНУ223. Доведена здатність *P. shermanii* - 4 стимулювати приріст біомаси біфідобактерій завдяки наявності у культуральній рідині 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти. За допоногою ВЕРХ було визначено вміст 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти у супернатанті консорціуму у кількості 4,1 мг/л, а також в фільтраті культуральної рідини монокультури пропіоновокислих бактерій – 6,7 мг/л.

6. Розроблено технологічні схеми отримання синбіотика та безклітинних пробіотиків: «Біфідопропіонік™», «Бігестім™», «БМП™». Отримані дієтичні добавки за органолептичними та фізико-хімічними показниками мали порошкоподібну структуру, специфічний смак та запах. За мікробіологічними показниками «Біфідопропіонік™» містить *B. longum* - ЯЗ у кількості  $4 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup> *P. shermanii* - 4 –  $3 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>, а кількість 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти – 4,1 мг/л; препарат «БПМ™» містить 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти у кількості 4,1 мг/л і не містить пробіотичних клітин; безклітинний пробіотик «Бігістім™» містить 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти – 6,7 мг/л.

7. З врахуванням результатів експериментальних даних рекомендовано БАД з нативною формою пробіотика зберігати в холодильнику (за температури +2 .. + 6 °С) - 12 місяців, а в морозильній камері (при температурі -18 ..- 12 °С) - 18 місяців. Протягом всього строку зберігання препаратів «Біфідопропіонік™» «БПМ™», «Бігістім™» вміст 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти залишався на рівні 4,1 мг/л, 4,1 мг/л та 6,7 мг/л відповідно.

8. Розроблено проект нормативної документації з отримання наступних функціональних інгредієнтів: «Біфідопропіонік™» (ТУ У 24.14-02071062-001:2017 та ТІ) – на основі пробіотичних культур; «БПМ™» (ТУ У 24.14-02071062-002:2017 та ТІ) – на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму *Bifidobacterium longum* - ЯЗ *Propionibacterium shermanii* - 4; «Бігестім™» (ТУ У 24.14-02071062-003:2017 та ТІ) – на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму пробіотичної культури *Propionibacterium shermanii* - 4). Проведено промислову апробацію отриманих препаратів на підприємстві ТОВ «Аріадна». Собівартість отриманих функціональних інгредієнтів складає: для препарату «Біфідопропіонік™» становить 50,73 грн; для препарату «БПМ™» – 30,73 грн; для препарату «Бігестім™» – 30,73 грн.

## СПИСОК ПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТТАЦІЇ

### 1. Статті у наукових фахових виданнях

1. Капрельянц Л.В., Труфкаті Л.В., Крупицька Л.О. Поживне середовище для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на основі рослинної сировини //

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2015. Т. 17, № 4. С. 47-54.

2. Капрельянц Л.В., Труфкаті Л.В., Крупицька Л.О. Поживне середовище для підрахунку кількості життєздатних клітин біфідобактерій у продуктах харчування та препаратах пробіотичного призначення // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2016. Т. 18, №. 1-4. С. 70-75.

3. Research into fatty acid composition of probiotic consortiums with the inclusion of propionic acid bacteria / L. Krupyt'ska et al // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2017. №. 3 (6). С. 15-20.

4. Krupyt'ska L.O., Kaprelyants L.V., Trufkati L.V. Investigation of the antagonistic activity of secondary metabolites of propionic acid bacteria // Харчова наука і технологія. 2017. Т.11, № 2. С. 16-20.

5. Безвідходна біотехнологія отримання симбіотика і метабіотика на основі *Bifidobacterium longum*–Я 3 та *Propionibacterium shermanii*–4 / Крупицька Л.О. та ін. // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2017. Т. 20, № 85. С. 148-154.

## 2. Статті в інших наукових виданнях

6. Капрельянц Л.В., Крупицька Л.А. Пробиотические свойства и биохимический потенциал пропионовоокислых бактерий // Мікробіологія і біотехнологія. 2017. № 1 (37). С. 6-15.

7. Капрельянц Л.В., Труфкаті Л.В., Крупицька Л.О. Режими сумісного культивування біфідо- та пропионовоокислих бактерій // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. № 74. С. 143-149.

8. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В. Жирнокислотний склад біологічно активних добавок з включенням пропионовоокислих бактерій // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. №. 73. С. 143-149.

9. Капрельянц Л.В., Труфкаті Л.В., Крупицька Л.О. Усовершенствование состава питательной среды для культивирования бифидобактерий // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. 2015. Вип. 48. С. 98-103.

## 3. Патенти

10. Композиція інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium*: пат. на корисну модель 107738 Україна: МПК С12N 1/20 / Капрельянц Л.В., Труфкаті Л.В., Крупицька Л.О.; власник ОНАХТ № у 2015 11451; заявл. 29.01.2016; опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12.

## 4. Матеріали конференцій

11. Капрельянц Л.В., Крупицька Л.А. Разработка технологий симбиотических биологически активных добавок // Матеріали 75 наукової конференції викладачів академії, Одеса 20-24 квітня 2015р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2015. С. 60.

12. Капрельянц Л.В., Крупицька Л.О. Пробиотичних комплекс з пропионовоокислими бактеріями // Харчові продукти та біотехнологія: сучасний стан

та перспективи розвитку: матер. міжн. наук.-практ. конф., Полтава 17-18 грудня 2015 р. / Полтавський ун-т економіки та торгівлі. Полтава, 2016. С. 10.

13. Крупицька Л.О. Вплив пребіотиків різної природи на приріст біомаси пропіоновокислих бактерій. // Збірник наукових праць молодих учених. Аспірантів та студентів, Одеса. 2016р. С. 71.

14. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В. Вплив пребіотиків різної природи на приріст біомаси біфідобактерій. // Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека: матер. міжн. наук.-практ. конф., Київ 12-13 травня 2016 р. / Нац. ун-т харч. технологій. Київ, 2016р. С. 130.

15. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В. Вплив вторинних метаболітів *Propionibacterium shermanii* - 4 на ріст *Bifidobacterium bifidum* - 1 // Біологія рослин та біотехнології: збірка тез III конференції молодих учених, Київ 16-18 травня 2017 р. / Національний авіаційний університет, Київ, 2017р. С. 70.

16. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В., Кирилов В.Х., Труфкати В.Л. Оптимізація параметрів сумісного культивування *Bifidobacterium longum* - 1 та *Propionibacterium shermanii* - 4. // Хімія, біо- і нанотехнології, екологія і економіка в пищевій і косметическій помышленности: Сборник материалов IV Международной наук.-практ. конф., Харьков 17-18 октября 2017г. / Харьковский государственный университет питания и торговли. Харьков, 2017. С. 25-27.

17. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В. Біотехнологія отримання комбінованих пробіотичних препаратів. // Збірник тез доповідей 77 наукової конференції викладачів академії, Одеса 18-21 квітня 2017 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2017. С. 76-78.

18. Крупицкая Л.А., Капрельянц Л.В., Труфкати Л.В. Определение содержания 1,4-гидрокси-2-нафтоиноновой кислоты в культуральной жидкости *Propionibacterium shermanii* - 4 // Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського, Одеса 11-15 вересня 2017 р. / Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова. Одеса, 2017. С. 27-29.

19. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В., Труфкати В.Л. Біотехнологія виробництва пребіотика неуглеводної природи. // Збірник тез доповідей 78 наукової конференції викладачів академії, Одеса 23-27 квітня 2018 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2018. С. 66-68.

## АНОТАЦІЯ

Крупицька Л. О. «Розробка технологій синбіотичних біологічно активних добавок». – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеню кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20. – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій Міністерства освіти і науки України, Одеса, 2016.

Дисертаційна робота присвячена науковому обґрунтуванню і розробці технологій отримання синбіотичних біологічно активних добавок як на основі клітинної, так і на основі безклітинної форми пробіотика.

Розроблено поживне соєво-лактозне середовище культивування, де у якості стимулятора росту рослинного походження використовували соєву сироватку у кількості 3 % від загального об'єму середовища культивування.

Було вивчено динаміку росту бактерій родів *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* на розробленому соєво-лактозному середовищі. Визначено, що накопичення максимальної кількості біомаси консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій можливе за раціональних режимів сумісного культивування на соєво-лактозному середовищі протягом 24 годин за температури 34 °С.

Досліджено жирнокислотний склад культуральної рідини пробіотичних мікроорганізмів як в монокультурі, так і у консорціумі. За здатністю до сумісного культивування та біохімічними показниками було обрано штами *B. longum* - ЯЗ та *P. shermanii* - 4 для подальших досліджень та створення ефективних препаратів для корекції дисбактеріозів ШКТ.

У ході дослідницької роботи виявлено стимулюючу дію супернатанту пропіоновокислих бактерій у кількості від 2 до 3 мл на приріст біомаси бактерій роду *Bifidobacterium*. Доведено, що біфідогенна активність супернатанту *P. shermanii* - 4 зумовлена синтезом 1,4-гідроксі-2-нафтоїнової кислоти у кількості 6,7 г/л. Було рекомендовано використання 1,4-гідроксі-2-нафтоїнової кислоти у якості самостійної дієтичної добавки з вираженими пребіотичними властивостями.

Проведені дослідження «in vitro» виживання біфідо- та пропіоновокислих бактерій як в монокультурі, так і у складі симбіотичного консорціуму в умовах, що імітують шлунково-кишковий тракт. Встановлено дещо вищу резистентність як біфідо- так і пропіоновокислих бактерій у складі консорціуму, ніж в монокультурі.

На основі отриманих даних було розроблено біотехнологію безвідходного виробництва синбіотичних біологічно активних добавок як на основі клітинної, так і на основі безклітинних форм пробіотиків.

Досліджено мікробіологічні, органолептичні та фізико-хімічні властивості отриманих продуктів.

Розроблено технологічні схеми отримання продуктів. Наведено економічне обґрунтування виробництва біологічно активних добавок. Проведено медико-біологічні дослідження.

**Ключові слова:** біфідобактерії, пропіоновокислі бактерій, супернатант, 1,4-гідроксі-2-нафтоїнова кислота, метабіотиотик, синбіотик.

## АННОТАЦІЯ

Крупицкая Л. А. «Разработка технологий синбиотических биологически активных добавок». - Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20. - биотехнология. - Одесская национальная академия пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Одесса, 2016.

Диссертация посвящена научному обоснованию и разработке технологий получения синбиотических биологически активных добавок как на основе клеточной, так и на основе бесклеточных форм пробиотиков.

Разработано питательную соєво-лактозную среду культивирования, где в качестве стимулятора роста растительного происхождения использовали соевую сыворотку в количестве 3% от общего объема среды культивирования.

Было изучено динамику роста бактерий родов *Bifidobacterium* и *Propionibacterium* на разработанной соево-лактозной среде. Определено, что накопление максимального количества биомассы консорциума бифидо- и пропионовокислых бактерий возможно при рациональных режимах совместного культивирования на соево-лактозной среде в течение 24 часов при температуре 34 °С.

Исследовано жирнокислотный состав культуральной жидкости пробиотических микроорганизмов как в монокультуре, так и в консорциуме. По способности к совместному культивированию и биохимическим показателям были выбраны штаммы *B. longum* - ЯЗ и *P. shermanii* - 4 для дальнейших исследований и создания эффективных препаратов для коррекции дисбактериозов ЖКТ.

В ходе исследовательской работы выявлено стимулирующее действие супернатанта пропионовокислых бактерий в количестве от 2 до 3 мл на прирост биомассы бактерий рода *Bifidobacterium*. Доказано, что бифидогенная активность супернатанта *P. shermanii* - 4 обусловлена синтезом 1,4-дигидрокси-2-нафтоиновой кислоты в количестве 6,7 г/л. Было рекомендовано использование 1,4-дигидрокси-2-нафтоиновой кислоты в качестве самостоятельной диетической добавки с выраженными пребиотическими свойствами.

Проведенные исследования «in vitro» выживания бифидо- и пропионовокислых бактерий как в монокультуре, так и в составе симбиотического консорциума в условиях, имитирующих желудочно-кишечный тракт. Установлено несколько более высокую резистентность как бифидо- так и пропионовокислых бактерий в составе консорциума, чем в монокультуре.

На основе полученных данных было разработано биотехнологию безотходного производства синбиотичных биологически активных добавок как на основе клеточной, так и на основе бесклеточных форм пробиотиков.

Исследовано микробиологические, органолептические и физико-химические свойства полученных продуктов.

Разработаны технологические схемы получения продуктов. Приведено экономическое обоснование производства биологически активных добавок. Проведения медико-биологические исследования.

Ключевые слова: бифидобактерии, пропионовокислые бактерий, супернатант, 1,4-гидрокси-2-нафтоиновая кислота, метабиотиотик, синбиотики.

## SUMMARY

Kruputska L. O., "Development of technologies for synbiotic biologically active additives". - The manuscript. Thesis for a Candidate Degree in Engineering by specialty 03.00.20. - biotechnology - Odessa National Academy of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Odessa, 2018.

In recent years, due to the deterioration of the environment, stress, the influence of chemical and physical factors, the branch of biologically active additives (BAAs), which is aimed at the restoration of human microbiocenosis of the gastrointestinal tract (gastrointestinal tract), has been rapidly developing. Supplements are concentrates of biologically active substances, which are intended for direct administration or introduction into food products for the purpose of enrichment of a person's diet with separate

biologically active substances or their complexes. For convenience, dietary supplements are conventionally divided into three main groups: nutraceuticals, parapharmaceuticals, probiotics and prebiotics.

Drug-probiotics have proven themselves as a means of prevention and treatment of dysbiosis of the gastrointestinal tract. Due to its biological properties, probiotic strains of bacteria of the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* are the most commonly used in the production of probiotics and probiotic products. However, in recent years, more and more cases have been observed where the positive effect of probiotics, even with prolonged use, is temporary, and sometimes it is completely absent; therefore, the most urgent task of biotechnology is the development of new biocorrectors that help to eliminate these problems when used. In this regard, experts place great hopes on a group of metabolic pro- and synbiotics.

Metabiotics are structural components of probiotic bacteria, their metabolites or signal molecules with a known chemical structure. The drugs of the group of metabolic probiotics, in comparison with the cellular form, are more safe, have a longer shelf life, reduce the interaction with the components of food products.

In recent years, experts have paid attention to propionic acid bacteria, which can carry positive effects on the obligate microbiote of the human's gut. Bacteria of the genus *Propionibacterium* are the most promising microorganisms for the production of both probiotics and metabolites, based on the products of their life.

To remove the largest quantity of qualitative biomass of probiotic bacteria, a nutrient medium was added with the addition of a vegetative growth stimulator (soy serum). To determine the most successful concentration of soy serum, the dynamics of growth of bifidobacteria on the lactose membrane of cultivation with the content of different mass fractions of soy serum in the amount from 1% to 6% was studied. According to the experimental data, for further studies, a culture medium was added with 3% soy serum added.

After studying the chemical composition of nutrient media, literary sources and taking into account the coherent cultivation of propionic acid bacteria with bifidobacteria, the growth and development of propionic acid bacteria were studied at cultivation on the following media: MRS medium; cheese whey medium; lactose medium with addition of 3% soya serum. The biochemical parameters of the growth rate of propionic acid bacteria on the soybean-lactic medium (CRL), expressed in the colony of the producing units, were higher than that of cultivating in other media, and the stationary phase was longer. It was also experimentally proved the expediency of replacing dry lactose with serum cheese in the amount of 200 ml/l, as a source of carbohydrates in the culture medium of the consortium of bifidobacteria and propionic acid bacteria.

Based on experimental studies and methods of mathematical modeling, it has been established that the largest number of viable probiotic microorganisms reaches  $Lg 10.75$  CFU/cm<sup>3</sup> under the following optimal conditions: cultivation for 24 hours at a temperature of  $T = 33.74$  °C, pH = 7.

Thanks to high-performance liquid chromatography (HPLC), the most valuable composition of the LC was the fermentation of the symbiotic consortium *Bifidobacterium longum* - Ya3 and *Propionibacterium shermanii* - 4. In this sample, the amount of

unsaturated fatty acids (78.36%) was higher than in the other samples under study. The amount of linoleic acid was 23.99%. In addition, according to preliminary results, probiotic leaven from the consortium *B. longum* - Ya3 and *P. shermanii* - 4 was characterized by the highest rates of biochemical activity, so it was chosen for further research.

According to the results of experimental studies of culture fluid containing *P. shermanii* - 4 metabolites, it is recommended to use *P. shermanii* - 4 supernatant from 2% to 3% as a growth stimulator of bifidobacteria. It has also been established that secondary exometabolites of *P. shermanii* - 4 culture fluid are capable of antagonistic activity in relation to opportunistic microbiota. The greatest sensitivity to the secondary metabolites *P. shermanii* - 4 was found in *Bacillus cereus* - ATCC11778 and *Staphylococcus aureus* - ONU223. With the increase in the amount of filtrate of the culture fluid of propionic acid bacteria, the sensitivity of opportunistic strains increased.

The HPLC determined the quantitative content of 1,4-hydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) in the supernatants of the consortium *B. longum* - Ya3 and *P. shermanii* - 4 and the monoculture *P. shermanii* - 4. It is 1,4-hydroxy-2-naphthoic acid determines the bifidogenic effect of propionic acid bacteria. Recovery NAD + is considered responsible for the ability of propionic acid bacteria to stimulate the development of bifidobacterial cultures using DHNA. It was determined that in the supernatant of the consortium containing 19.0 ... 20.1% of dry substances contained 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid in the amount of 0.07% (4.1 mg / l), and in the filtrate of culture liquid monoculture propionic acid bacteria containing 19,1 ... 20,3% of dry matter - 0,12% (6,7 mg/l) .

The experimental data obtained indicate the expediency of the use of culture liquid supernatants both for the production of a probiotic of a metabolic type and for the construction of polystimal synbiotic using DHNA as a prebiotic of non-carbohydrate nature.

The experimental data obtained indicate the expediency of the use of culture liquid supernatants both for the production of a probiotic of a metabolic type and for the construction of polystimal synbiotic using DHNA as a prebiotic of non-carbohydrate nature.

Based on the received data, biotechnology was developed for obtaining biologically active additives on the basis of cellular and non-cellular forms of probiotics, namely: "Bifidopropionic " - a drug on the cells of the consortium *B. longum* - Ya3 and *P. shermanii*- 4; "BPM" - based on the metabolites contained in the culture liquid of the consortium *B. longum* - Ya3 and *P.shermanii* - 4; "Biggestim" is a preparation based on the culture fluid *P. shermanii* - 4 containing the products of metabolism (DHNA).

Key words: bifidobacteria, propionic acid bacteria, supernatant, 1,4-hydroxy-2-naphthoic acid, metabiotic, synbiotic.

Підписано до друку 25.09.2018 р. Формат 60×90/16.

Об'єм 0,9 умов. друк. арк.

Тираж 100 прим.

---

ОНАХТ, 65039, м. Одеса-39, вул. Канатна, 112.