

**ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

КРУПИЦЬКА ЛАРИСА ОЛЕКСАНДРІВНА

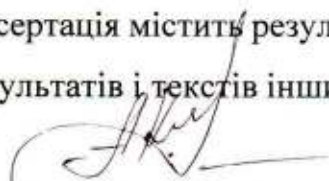
УДК [679.872+ 579.873, 1] : 57.083.1 : 546.33

**ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СИНБІОТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО
АКТИВНИХ ДОБАВОК**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія (технічні науки)

Подається на здобуття наукового
ступеня кандидата технічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

 Л. О. Крупицька

*Примірник дисертаційної роботи
ідентичний іншим примірникам*

Науковий керівник
Капельяниц Леонід Вікторович
доктор технічних наук, професор

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
д.т.н., професор

Г. В. Крусір



Одеса – 2018

АНОТАЦІЯ

Крупницької Л.О. Розробка технологій синбіотичних біологічно активних добавок. – Кваліфіційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20. – «Біотехнологія». – Одеська національна академія харчових технологій, Одеса, 2018.

В останні роки у зв'язку з погіршенням умов навколишнього середовища, стресів, впливу хімічних та фізичних факторів, стрімкого розвитку набула галузь біологічно активних добавок (БАД), дія яких направлена на відновлення мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини. БАД - це концентрати біологічно активних речовин, які призначені для безпосереднього прийому або введення до складу харчових продуктів з метою збагачення раціону харчування людини окремими біологічно активними речовинами або їх комплексами. Для зручності БАД умовно розподіляють на три основні групи: нутрицевтики, парафармацевтики, пробіотики і пребіотики.

Препарати-пробіотики добре зарекомендували себе у якості засобів профілактики і лікування дисбактеріозу ШКТ. Завдяки своїм біологічним властивостям, пробіотичні штами бактерій роду *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* є найбільш розповсюдженими у виробництві препаратів-пробіотиків та продуктів пробіотичного призначення. Проте в останні роки все частіше спостерігались випадки, коли позитивний ефект пробіотиків, навіть при тривалому застосуванні, носить тимчасовий характер, а часом і повністю відсутній, тому особливо актуальною задачею біотехнології є розробка нових біокоректорів, що сприяють усуненню зазначених проблем при їх використанні. У зв'язку з цим, фахівці покладають великі надії на групу метаболітних про- і синбіотиків.

Метабіотки є структурними компонентами пробіотичних бактерій, їх метаболітами чи сигнальними молекулами з відомою хімічною структурою.

Препарати групи метаболітних пробіотиків, в порівнянні з клітинною формою, є більш безпечними, мають більш тривалий термін придатності до застосування, зменшують взаємодію з компонентами харчових продуктів.

В останіроки фахівці приділяють увагу пропіоновокислим бактерії, які здатні здійснювати позитивні ефекти на облігатну мікробіоту ШКТ людини. Літературні дані свідчать, що пропіоновокислі бактерії синтезують вітамін B12 та біфідогенні ростові фактори, мають високі адгезивні властивості, здатні знижувати генотоксічну дію ряду хімічних сполук і УФ-променів, на відміну від інших пробіотичних мікроорганізмів, синтезують антиоксидантний фермент каталазу, що руйнує вільні радикали. Зважаючи, на все вище сказане, бактерії роду *Propionibacterium* є найбільш перспективними мікроорганізмами для створення, як пробіотиків, так і метабіотиків, на основі продуктів їх життєдіяльності.

Для отримання найбільшої кількості якісної біомаси пробіотичних бактерій було розроблено поживне середовище з додаванням рослинного стимулятора росту (соєвої сироватки). Соєва сироватка містить пребіотичні олігосахариди, а саме, рафінозу та стахіозу, які стимулюють ріст біфідобактерій. Для визначення найбільш вдалої концентрації соєвої сироватки вивчали динаміку росту біфідобактерій на лактозному середовищі культивування з вмістом різної масової частки соєвої сироватки у кількості від 1 % до 6 %. За результатами експериментальних даних для подальших досліджень було обрано середовище культивування з додаванням 3 % соєвої сироватки.

Після вивчення хімічного складу поживних середовищ, літературних джерел та з урахуванням сумісного культивування пропіоновокислих бактерій з біфідобактеріями, досліджували ріст та розвиток пропіоновокислих бактерій при культивуванні на наступних середовищах: MRS-середовищі; середовищі із сирної сироватки; лактозному середовищі з додаванням 3 % соєвої сироватки. Біохімічні показники динаміки росту пропіоновокислих бактерій на соєволактозному середовищі (СЛС), які

виражали в колоніє утворюючих одиницях, були вищими за показники при культивуванні на інших середовищах, а стаціонарна фаза була більш тривалою. Також було експериментально доведено доцільність заміни сухої лактози на сирну сироватку у кількості 200мл/л, у якості джерела вуглеводів середовища культивування консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій.

На основі експериментальних досліджень та методах математичного моделювання, встановлено, що найбільша кількість життєздатних пробіотичних мікроорганізмів сягає $10,75 \text{ Lg КУО/см}^3$ за наступних оптимальних умов: культивування протягом 24 годин за температури $T = 33,74 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$.

Завдяки високоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) встановили, що найцінніший склад ЖК мала закваска симбіотичного консорціуму *Bifidobacterium longum* - ЯЗ і *Propionibacterium shermanii* - 4. В даному зразку сума ненасичених жирних кислот (78,36%), була вищою, ніж в інших досліджуваних зразках. Кількість лінолевої кислоти становило 23,99%. Крім того, за попередніми результатами даних пробіотична закваска консорціуму *B.longum* - ЯЗ і *P.shermanii* - 4 характеризувалася найвищими показниками біохімічної активності, тому її обрано для наступних досліджень.

За результатами експериментальних досліджень культуральної рідини, що містить метаболіти *P. shermanii* - 4, рекомендовано використовувати супернатант *P. shermanii* - 4 у кількості від 2% до 3%, як стимулятор росту біфідобактерій. Також встановлено, що вторинні екзометаболіти культуральної рідини *P. shermanii* —4 здатні до антоганістичної активності по відношенню до умовно-патогенної мікробіоти. Найбільшу чутливість до вторинних метаболітів *P.shermanii* - 4 виявлено у *Bacillus cereus* - ATCC11778 та *Staphylococcus aureus* - ОНУ223. Зі збільшенням кількості фільтрату культуральної рідини пропіоновокислих бактерій збільшувалась чутливість умовно-патогенних штамів.

За допомогою ВЕРХ визначили кількісний вміст 1,4-гідроксі-2-нафтоїнової кислоти (DHNA) в супернатантах консорціуму *B.longum* - ЯЗ і *P.shermanii* - 4 і монокультури *P. shermanii* - 4. Саме 1,4-гідроксі-2-нафтоїнова кислота зумовлює біфідогенний ефект пропіоновокислих бактерій. Відновлення NAD⁺ вважають відповідальним за здатність пропіоновокислих бактерій стимулювати розвиток культур біфідобактерій за допомогою DHNA. Визначено, що у супернатанті консорціуму із вмістом 19,0...20,2 % сухих речовин містилось 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнова кислота у кількості 0,07 % (4,1 мг/л), а в фільтраті культуральної рідини монокультури пропіоновокислих бактерій із вмістом 19,1...20,3 % сухих речовин – 0,12 % (6,7мг/л).

Отримані експериментальні дані свідчать про доцільність застосування супернатантів культуральної рідини як для створення пробіотика метаболітного типу, так і для конструювання поліштамового синбіотика, використовуючи DHNA як пребіотик не вуглеводної природи.

На основі отриманих даних була розроблена біотехнологія отримання біологічно активних добавок на основі клітинної і безклітинної форм пробіотика, а саме: «Біфідопропіонік[™]» – препарат на основі клітин консорціуму *B.longum* -ЯЗ і *P.shermanii* - 4; «БПМ[™]» – на основі метаболітів, що містились у культуральній рідині консорціуму *B.longum* - ЯЗ і *P.shermanii* - 4; «Бігістім[™]» – препарат на основі культуральній рідині *P.shermanii* - 4, що містить продукти метаболізму (DHNA).

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

Summary

Krupitskaya L.O. Development of the technology of synbiotic biologically active additives. - Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation work for obtaining a scientific degree of the candidate of technical sciences (doctor of philosophy) in specialty 03.00.20. - "Biotechnology". - Odessa National Academy of Food Technologies, 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. Literary data suggest that propionid bacteria synthesize vitamin B12 and bifidogenic growth factors, which have high adhesive properties, which can reduce the genotoxic effect of a number of chemical compounds and UV rays, in contrast to other probiotic microorganisms, synthesize an antioxidant enzyme of catalase that destroys free radicals. In view of all the above, 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). Soya whey contains prebiotic oligosaccharides, namely, raffinose and stochiose, which stimulate the growth of bifidobacteria. 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 $10.75 \text{ Lg CFU/cm}^3$ under the following optimal conditions: cultivation for 24 hours at a temperature of $T = 33.74^\circ \text{C}$, $\text{pH} = 7$.

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* - Ya 3 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 (4.1 mg/l, and in the filtrate of culture liquid monoculture propionic acid bacteria containing 19,1 ... 20,3 % of dry matter - 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* - Ya 3 and *P. shermanii* - 4; "BPM" - based on the metabolites contained in the culture liquid of the consortium *B. longum* - Ya 3 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, metabolite.

СПИСОК ПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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. Krupytska et all // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2017. №. 3 (6). С. 15-20.

4. Krupytska 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., Крупицкая Л.А. Пробиотические свойства и биохимический потенциал пропионовокислых 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 пропіоновокислих 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 пропіоновокислих бактерій // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. №. 73. С. 143-149.

9. Капрельянц Л.В., Труфкати Л.В., Крупицкая 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 № u 2015 11451; заявл. 29.01.2016; опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12.

4. Матеріали конференцій

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

12. Капрельянц Л.В., Крупицкая Л.О. Пробиотичних комплекс з пропіоновокислими 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. // Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности: 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., Труфкаті 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.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
Вступ.....	6
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН І ПРОБЛЕМИ ВИРОБНИЦТВА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК.....	12
1.1. Пробіотики. Пробіотичні мікроорганізми та їх вплив на організм людини.....	1
2	
1.2. Пребіотики основні поняття, вимоги, що пред'являються до них, механізм їх дії	15
1.3. Синбіотики і їх роль у функціональному харчуванні.....	19
1.4. Метабіотики – нове покоління пробіотиків.....	20
1.4.1. Основа метабіотика та механізм його дії.....	21
1.4.2. Джерела низькомолекулярних біологічно активних речовин.....	23
1.5. Пропіоновокислі бактерії та їх біологічні властивості.....	24
1.5.1. Морфологічні та фізіологічні ознаки бактерій роду <i>Propionibacterium</i>	25
1.5.2. Пробіотичні властивості пропіоновокислих бактерій.....	27
1.6. Характеристика представників роду <i>Bifidobacterium</i>	30
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1.....	31
Список використаних джерел.....	34
 РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	46
2.1. Схема проведення досліджень.....	46
2.2. Сировина та препарати, що використовували в досліджах.....	48
2.3. Організація та методи досліджень.....	48
2.3.1. Культивування бактерій роду <i>Bifidobacterium</i>	48
2.3.2. Підрахунок бактерій роду <i>Bifidobacterium</i>	52

2.3.3. Культивування пропіоновокислих бактерій.....	52
2.3.4. Підрахунок бактерій роду <i>Propionibacterium</i>	53
2.3.5. Екстракція ліпідів.....	53
2.3.6. Визначення жирно-кислотного складу пробіотичних мікроорганізмів.....	54
2.3.7. Отримання метаболітної безклітинної форми пробіотика.....	54
2.3.8. Дослідження антагоністичної активності супернатанту симбіотичного консорціуму пробіотичних мікроорганізмів.....	55
2.3.9. Визначення 1,4-гідроксі-2-нафтоїнової кислоти.....	55
2.3.10. Математико-статистичні методи обробки результатів досліджень.....	56
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 2.....	57
Список використаних джерел.....	58
 РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СИНБІОТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК.....	59
3.1. Розробка середовища культивування бактерій роду <i>Bifidobacterium</i>	59
3.2. Культивування бактерій роду <i>Propionibacterium</i>	75
3.3. Підбір режимів сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій.....	78
3.4. Визначення жирнокислотного складу пробіотичних консорціумів з включенням пропіоновокислих бактерій.....	83
3.5. Вплив пребіотиків на ріст та розвиток пробіотичних культур.....	90
3.6. Визначення антагоністичної активності вторинних метаболітів <i>Propionibacterium shermanii</i> -4.....	92
3.7. Визначення вмісту 1,4-гідрокси-2-нафтоїнової кислоти в культуральній рідині <i>Propionibacterium shermanii</i> - 4.....	96

3.8. Дослідження властивостей консорціуму біфідо - та пропіоновокислих бактерій в умовах <i>in vitro</i>	98
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.....	106
Список використаних джерел.....	108

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ СИНБІОТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК.....112

4.1. Оптимізація умов культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій.....	112
4.2. Розробка технології виготовлення синбіотичної біологічно активної добавки «Біфіпропіонік [™] ».....	122
4.3. Розробка технології виготовлення функціонального інгредієнту «БПМ [™] ».....	126
4.4. Розробка технології отримання функціонального інгредієнту «Бігестім [™] ».....	128
4.5. Промислова апробація технології отримання синбіотичних біологічно активних добавок.....	130
4.6. Медико-біологічні дослідження.....	137
4.7. Розрахунок економічної ефективності синбіотичних біологічно активних добавок.....	138
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4.....	143
Список використаних джерел.....	145
Загальні висновки.....	146
ДОДАТКИ.....	149

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ACNQ – 2-аміно-3-карбокси-1,4-нафтохінон
- DHNA – 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнова кислота
- БАД – біологічно активні добавки
- БГС – біфідогенний стимулятор
- ВООЗ – всесвітня організація охорони здоров'я
- ЖК – жирні кислоти
- КЛЖК – коротко-ланцюгові летючі жирні кислоти
- КЛК – кон'югована ліолева кислота
- КЛС – кукурудзяно-лактознає середовище
- КУО – колонієутворюючі одиниці
- МНЖК – мононенасичені жирні кислоти
- НБАВ – низькомолекулярні біологічні активні речовини
- ПКБ – пропіоновокислі бактерії
- ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти
- РБС – ростовий біфідогенний стимулятор
- СОД – супероксиддисмутаза
- СОС – соєві олігосахариди
- ТОС – траноглікозовані олігосахариди
- ФАО (англ. Food and Agriculture Organization, FAO) – продовольча та сільськогосподарська організація
- ФОС – фруктоолігосахариди
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

Промислове виробництво збалансованих харчових продуктів завжди було однією з найважливіших проблем людства. Людина і навколишнє середовище представляють єдину екологічну систему, яка знаходиться у стані біологічної рівноваги. Нормальна мікробіота шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини представляє мікробний пейзаж сформований в процесі тривалої еволюції.

Складна мікроекологічна система організму людини представлена станом динамічної рівноваги, яке визначається, з одного боку, його фізіологічними та імунологічними особливостями, а з іншого – кількісним та якісним складом мікробних асоціацій. На тлі різкого зниження популяційного рівня біфідобактерій і лактобацил, зростає кількість умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, що сприяє розвитку дисбактеріозу. У зв'язку з цим, пошук нових засобів профілактики для корекції дисбіотичних порушень набуває актуальності.

Основними діючими компонентами полівидових препаратів-пробіотиків є живі пробіотичні мікроорганізми, які володіють антагоністичними властивостями до широкого спектру патогенних та умовно-патогенних бактерій. Їх основне призначення – це нормалізація мікробіоти хазяїна.

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 біологічно активних добавок (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.

Актуальність теми. Використання антибіотиків і різних фармацевтичних препаратів, вплив радіохвиль і хіміотерапії, вплив ксенобіотиків їжі призводить до розвитку захворювань ШКТ та інших органів і систем організму людини. Біологічні бактеріальні препарати добре зарекомендували себе у якості засобів профілактики і лікування дисбактеріозу ШКТ. Проте, в останні роки при їх застосуванні спостерігається зниження їх ефективності, нестабільність результатів лікування, особливо в сенсibiliзованому організмі, оскільки гетерогенна мікробна маса препарату, а іноді і додатково включені до його складу компоненти, створюють значне антигенне навантаження на організм. Також існують складнощі при використанні біопрепаратів та продуктів функціонального призначення – це сприйнятливості до кисню і нагрівання, їх вразливість при проходженні через захисні бар'єри ШКТ.

У зв'язку з цим особливо актуальною є розробка нових препаратів для корекції дисбактеріозів, що сприяють усуненню зазначених проблем при їх використанні. Найбільш перспективним напрямком вирішення цієї проблеми є препарати з групи метаболітних пробіотиків, які 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 попіоновокислих 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, біотехнологія харчових продуктів і функціональних інгредієнтів.

Предмет дослідження – пребіотичні компоненти, структурні елементи метаболічної активності пробіотичних мікроорганізмів, біохімічні властивості мікроорганізмів, органолептичні, фізико-хімічні і мікробіологічні показники.

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 нативною клітинною і метаболітною безклітинною формами 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 компонентний склад та оптимальні умови і визначено склад середовища для сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій, яке відрізняється вмістом соєвої сироватки у кількості 3%. Доведено, що безклітинний пробіотик включає 1,4-гідроксі-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 із включенням продуктів метаболітної діяльності пробіотичних мікроорганізмів. 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, патентів. 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); 76 науковій конференції науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2016); міжнародній науково-практичній конференції «Оздоровчі харчові продукти дієтичні добавки: технологія, якість та безпека» (Київ, 2015); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії», присвячена до 100-річчя від дня народження професора Бориса Федоровича Сухомлинова (Львів, 2016), Третій конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 2017); 77 науковій конференції науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2017).

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.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН І ПРОБЛЕМИ ВИРОБНИЦТВА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК.

Майже у 90% населення України виявлено порушення кількісного та якісного складу шлунково-кишкової мікробіоти, що викликає дисбактеріоз ШКТ. Дисбактеріозами страждають пацієнти практично всіх стаціонарів і амбулаторних служб, жителі екологічно несприятливих регіонів [1].

Порушення нормальної мікробіоти формуються в результаті впливу на організм фізичних, хімічних, радіаційних та інших факторів. У зв'язку з цим виникає необхідність комплексного підходу до конструювання і відновлення оптимального рівня життя [2].

У теперішній час для підтримки і відновлення мікробіоти шлунково-кишкового тракту застосовують біологічно активні добавки, які позитивно впливають на склад кишкового мікробіоценозу [3].

БАД - природні або ідентичні природним біологічно активні речовини, призначені для вживання одночасно з їжею або введення до складу харчових продуктів. Для зручності БАД умовно розподіляють на три основні групи: нутрицевтики, парафармацевтики, пробіотики і пребіотики

1.1. Пробіотики. Пробіотичні мікроорганізми та їх вплив на організм людини.

Пробіотики - це живі мікроорганізми, використання яких в необхідній кількості нормалізують кишкову мікробіоту та мають лікувально профілактичну дію на організм людини [4, 5].

ФАО / ВООЗ рекомендує наступні ключові пробіотики: молочнокислі бактерії, переважно *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* непатогенні штами *Escherichia coli*, *Clostridium butyricus*, *Streptococcus salivarius*, *Saccharomyces boulardii* (непатогенні штами дріжджів), генетично модифіковані бактерії,

здатні секретувати імуномодулятори. У нашій країні найбільш популярними та вивченими пробіотиками є наступні види мікроорганізмів: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactococcus*, *Propionibacterium acnes*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*. Продукти можуть називатися пробіотичними, якщо підтверджені їх лікувально-профілактичний вплив [6, 7].

Відповідно пробіотичним продуктом називають функціональний харчовий продукт, який містить в якості фізіологічно функціонального інгредієнта спеціально виділені штами корисних для людини живих мікроорганізмів, які сприятливо впливають на організм людини через нормалізацію мікробіоти ШКТ [4, 8].

Пробіотичні мікроорганізми, які, як відомо, корисні для здоров'я людини можуть надходити до організму за допомогою ферментованих молочних продуктів або фармацевтичних засобів, одержаних з використанням життєздатних клітин, наприклад ліофілізованні препарати або таблетовані форми [9-11].

Сьогодні пробіотики поділяють на п'ять основних поколінь :

I покоління - класичні монокомпонентні пробіотики, до яких відносять рідкі або сухі препарати, що складаються з одного штаму мікроорганізмів («Біфідумбактерин», «Біфідумбактерин - форте», «Пробіфор», «Біфідоген», «Еугалан»);

II покоління - полікомпонентні препарати (симбіотиків), що включають різні штами мікроорганізмів або кілька культур бактерій-симбіонтів

(«Біфацід», «Біфікол», «ЕКОФЛОРА». «Біовестін», «Біовестін-лакто», «Лінекс», «Пробіотікс», «Ацідофіліс» і ін.);

III покоління - антогоністи, що самоелімінуються, які засновані на використанні неспецифічних для людини мікроорганізми і складаються з спорових бактерій і Сахароміцети («Спوروبактерії», «Бактиспорин», «Биоспорин», «Бактисубтил», «Флонівін-Б», «Ентерол»);

IV покоління – комбіновані препарати (синбіотики), що містять мікроорганізми і основу, яка несе додаткову функціональне навантаження, тобто речовини, що сприяють їх росту, розмноження і метаболічної активності («Ламінолакт», «Біфістім», «кіпацід», «Біфілор», «Біфітрілак», «Бифилиз», «Аципол», «Малюк».);

V покоління - безклітинні пробіотики, що містять продукти обміну автохтонної мікробіоти ШКТ («Хілак-форте») [12].

При конструюванні пробіотичних препаратів повинні відбиратися штами мікроорганізмів, що відповідають визначеним вимогам. Вони зводяться до наступного:

- безпека штамів, призначених для введення їх до складу пробіотиків;
- наявність антагоністичних властивостей до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори;
- стійкість до літичних ферментів слини (лізоцим), травних ферментів (пепсин, ліпаза) і до жовчі;
- стійкість до дії кислоти шлункового соку;
- адгезивна активність і колонізаційна резистентність;
- стійкість до антибіотиків;
- вища, порівняно з коменсальною мікрофлорою, питома швидкість росту пробіотичних культур, що дозволяє їм швидше освоїти живильний субстрат, а отже, збільшити продуктивність клітин пробіотичних штамів;
- штам повинен бути технологічним при виробництві (стабільним при культивуванні та інших стадіях технологічного процесу);
- імуномодуляторна та імуногенна дія пробіотика [13-16].

При цьому пробіотичний препарат повинен складатися з мікроорганізмів, які є облигатними представниками ШКТ людини. Індигенна мікробіота товстої кишки представлена лише кількома групами сахаролитичних неспорогенних анаеробних бактерій, які виконують ключову роль в підтримці оптимального складу мікробіоценозу і його функцій. Це, переважно, бактерії роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Propionibacterium*, що становлять основу як первинного нормобіоценоза ШКТ, так і нормобіоти дорослих людей різного віку [17].

Фізіологічно цінними компонентами мікробіому товстої кишки є біфідобактерії [18-21] і лактобацили [13, 18, 22, 23]. Ці мікроорганізми здатні синтезувати біологічно активні метаболіти, здатні надавати позитивний ефект на мікробіом ШКТ, пригнічуючи життєдіяльність багатьох патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, а так само стимулюють діяльність імунної системи господаря [22, 24, 25].

При виникненні дисбіотичних станів якісний і кількісний склад анаеробних біфідо- і лактобактерій зазнає порушення в першу чергу. Тому препарати і продукти харчування на їх основі набули широкого поширення.

Незважаючи на переконливі дані, що свідчать про постійну присутність пропіоновокислих бактерій в різних біотопах людини [12, 25-27], досліджень, які присвячені фізіологічній зціненості даної групи прокариот, як одного з найбільш важливих компонентів облигатної мікробіоти, значно менше, ніж аналогічних досліджень щодо лактобацил і біфідобактерій [17].

1.2. Пребіотики, основні поняття, вимоги, що пред'являються до них, механізм їх дії .

Пребіотики визначаються як функціональні харчові інгредієнти, які не здатні до перетравлювання, у вигляді речовини або комплексу речовин, що забезпечують при регулярному застосуванні в складі харчових продуктів оптимізацію мікроекологічного статусу організму людини за рахунок

вибіркової стимуляції активності корисної мікробіоти травного тракту. Як результат такої дії, відзначається поліпшення самопочуття людини [4, 28] .

До пребіотиків пред'являються такі вимоги [4, 29]:

- бути безпечними для макроорганізму;
- не піддаються гідролізу травних ферментів і не всмоктуються в верхніх відділах шлунково-кишкового тракту;
- бути селективним субстратом для одного або декількох родів облігатних представників мікробіоти ШКТ та мають стимулювати їх зростання і метаболічну активність;
- мати здатність поліпшувати склад мікробіома ШКТ
- індукувати корисні ефекти як на рівні шлунково-кишкового тракту, так і на рівні макроорганізму.

Пребіотичні вуглеводи присутні в таких фруктах і овочах, як: банани, ягоди, спаржа, часник, пшениця, вівсянка, ячмінь, лляне насіння, помідори, топінамбур, цибуля і цикорій, зелень (шпинат, селера, капуста, пагони гірчиці), бобові (сочевиця, квасоля, горох, чорні боби, соя) [4, 30].

Позитивні ефекти застосування пребіотиків реалізуються за допомогою вибіркової стимуляції росту індигенної мікробіоти з одночасним придушенням патогенної, умовно-патогенної мікробіоти і токсичних метаболітів. Все це сприяє стимуляції функції печінки, активізації імунної системи, зниженню рН вмісту товстої кишки. Як в наслідок, підвищується осмотичний тиск, що веде до затримки рідини в просвіті кишки і посиленню її перистальтики, призводить до збільшення бактеріальної маси, що супроводжується активною утилізацією аміаку[28, 31].

У пребіотиках міститься багато складних вуглеводів, молекули яких з'єднуються бета-глікозидними зв'язками. Вуглеводи потрапляють в ШКТ людини неперетравленими, тому що в нашому організмі немає ферментів, які спроможні їх розщеплювати, проте нормальна мікробіота здатна використовувати вуглеводи як субстрат [4, 32].

Чим більше в пребіотикиах бета-глікозидних зв'язків, тим корисніше вони для пробіотиків: наприклад, лактулоза - продукт переробки молока, вважається найкориснішим з пребіотиків - в ній таких молекулярних зв'язків більше, ніж в інших речовинах. Лактулоза використовується в медицині і харчовій промисловості: вона входить до складу препаратів і продуктів, які використовуються і рекомендованих для лікування і профілактики захворювань ШТК - хронічних закрепів, дисбактеріозів, порушень роботи печінки [32-34]. .

У багатьох країнах пребіотики виробляються в промисловому масштабі, при цьому більшу частину такої продукції становлять такі речовини, як фруктоолігосахаріди (ФОС), траноглікозовані олігосахариди (ТОС), лактулоза, соєві олігосахариди (СОС) [35-37]. Білкові і вітамінні пребіотики менш популярні в порівнянні з вуглеводними. В наш час існує чотири принципово різних напрямки промислового отримання пребіотиків (табл. 1).

Пребіотичні речовини виробляються з різних видів харчової сировини. Вони можуть бути екстраговані з природних джерел (галактоолігосахариди соєвих бобів) або отримані біотехнологічним шляхом із застосуванням специфічних ефекторів - карбогідраз. Джерелами їх отримання можуть служити також відходи і побічні продукти харчових виробництв: висівки, оболонки зернових, фруктова пульпа, жом цукрових буряків та тростини, макухи, картопляна вичавка, клітинні стінки рослин. Найбільш вивченими пребіотиками є фруктоолігосахариди, які зустрічаються у багатьох рослинах, таких як топінамбур, цикорій, банани, інжир, цибуля та ін. Дослідження показали, що найбільш сприятливі умови для прояву біфірогенних властивостей ФОС і інуліну спостерігається при низьких значеннях рН. На видовому рівні як інулін так і ФОС по-різному утилізуються біфідобактеріями. Найбільш активно метаболізують ці углеводи *B. infantis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum* і *B. breve*. Більшість досліджуваних біфідобактерій

воліють використовувати як джерело енергії і вуглецю ФОС, віддаючи їм перевагу перед глюкозою [38-40].

Таблиця 1

Способи отримання пребіотиків [37].

Спосіб отримання	Джерела	Пребіотичні речовини
З природних джерел	цукрова тростина, цукрові буряки, топінамбур, цикорій, молочна сировотка, водорості, гриби і актиноміцети, злакові (висівки), соя.	фруктоолігосахаріди, інулін, лактоглобулін, стійкий крохмаль, харчові волокна, гетероглюкани, лентинан, глікопентіди, галактоолігосахариди
Хімічний гідроліз	Галактани, ксилан, хітин, ламінаран, арабіноксилани, пектинові речовини	галактоолигосахариди, арабіноксилоолігосахариди, галактуроноолігосахариди, N-глюкозамінові олигосахариди
Хімічний синтез	лактоза, сахароза, мальтиоолігоцукри	лактулоза, трансгалактоолігосахариди,
Ферментативний синтез	Мальтодекстрини, сахароза, мальтоза, лактоза,	фруктоолигосахариди, изомальтоолігосахариди, лактулоза, циклодекстрини

Всі продукти, які містять у високі кількості пребіотичні речовини, вважаються функціональними харчовими продуктами, придатними для оздоровчо-лікувальної мети. В Україні до найбільш розвинутих груп функціональних продуктів відносяться пребіотичні кисломолочні продукти, що містять пребіотики. Так, в даний час в Україні виробляється кефір

«Лактонія», який збагачений лактулозою. Низка дослідів [41-46].показала, що молочні продукти, збагачені лактулозою, на відміну від звичайних кисломолочних продуктів, наділені вираженими біфідогенними властивостями, помітно підвищують популяційний рівень лактобацил і покращують загальний стан організму, включаючи мікроекологію ШКТ.

1.3. Синбіотики і їх роль у функціональному харчуванні

Стратегічним завданням сучасної харчової технології є створення функціонального харчування, що забезпечує підтримку та активізацію життєво важливих функцій людини, підвищення загальної опірності організму від агресивних умов середовища життєдіяльності. Особливу роль у функціональному харчуванні вчені надають продуктам, що сприяють оптимізації мікроекологічної статусу організму людини, вважаючи, що саме нормобіоценоз є запорукою імунобіологічної стабільності і здоров'я в цілому. Синбіотичні продукти найбільше відповідають цим критеріям, тому що сприяють колонізації ШКТ мікроорганізмами-пробіотиками та підвищенню біологічної активності власної позитивної мікробіоти, завдяки присутності в складі продукту пребіотичних інгредієнтів [30, 47, 48].

Таким чином, термін синбіотики використовується для позначення продуктів, що містять комбінацію пробіотиків і пребіотиків [49-51]. Дія синбіотиків полягає у синергичному впливі живих мікроорганізмів і неживих біологічно активних факторів, за допомогою якого найбільш ефективно відбувається колонізація мікроорганізмів-пробіотиків до епітелію ШКТ людини, а також стимулюється його власна мікробіота [52].

Мікробіологічна концепція синбіотика об'єднує позитивні риси пробіотиків і пребіотиків і реалізується в деяких природних продуктах, наприклад ферментованих овочах. У взаємовідносинах макроорганізма і мікробіоценозів домінують природні принципи взаємодій на рівні микробно-тканинного комплексу ШКТ [30, 48, 52].

1.4. Метабіотики – нове покоління пробіотиків.

Позитивний ефект пробіотиків, навіть при тривалому застосуванні, нерідко носить тимчасовий характер, а часом і повністю відсутній. Хоча безпечність використання пробіотичних препаратів і продуктів харчування є встановленим фактом, з'явилися окремі повідомлення про виникнення різних ускладнень у осіб, які тривалий час приймають живі пробіотичні мікроорганізми [53-55].

Слід зазначити, що ускладнення при прийомі препаратів-пробіотиків, спостерігалися лише у тих осіб, які страждали хронічними захворюваннями органів шлунково-кишкового тракту (виразкова хвороба, гастрити, хронічний панкреатит, гепатити та ін.), або перенесли гострі кишкових інфекцій, інтоксикацію після хіміотерапії при онкологічних захворюваннях, харчові отруєння, гострі кишкові інфекції [56-64].

Результати даних [60, 62] свідчать про те, що не всі пробіотичні бактерії безпечні, навіть якщо вони відносяться до бактерій родів *Lactobacillus* або *Bifidobacterium* і не мають генів патогенності. З показників медичних обстежень можна зробити висновок, що молочнокислі бактерії і навіть біфідобактерії, які використовуються у вигляді пробіотиків, іноді зв'язуються з опортуністичними інфекціями людини, особливо у пацієнтів, що проходять курс антибіотикотерапії, і у хворих з важким імунodefіцитом [61, 62].

В останні роки виявилось, що горизонтальний перенос генів може відбуватися між молочно-кислими бактерій і кишковими бактеріями, а також в межах одного роду молочнокислих бактерій [56, 59, 65, 66].

Перенесення генів зазвичай здійснюється шляхом трансформації, трансдукції, або кон'югації (процес перенесення частини генетичного матеріалу при безпосередньому контакті двох бактеріальних клітин) [67]. Відомо, що поширення резистенції до антибіотиків є основною глобальною проблемою біотехнології та охорони здоров'я.

Доведено, що мікроорганізми-пробіотики і автохтонні мікроорганізми можуть як стимулювати, так і пригнічувати ростові і антимікробні

властивості один одного. За результатами досліджень [68, 69]., пробіотичні бактерії поділяють на:

- біосумісні з домінантною мікробіотою індивідуума і здатні пригнічувати ріст патогенів;
- небіосумісні з нормобіотой, але здатні стимулювати її захисні властивості і володіють антагонізмом до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів
- небіосумісні, здатні пригнічувати антимікробні властивості автохтонного мікробіома ШКТ і володіють слабкою антагоністичною активністю до патогенів.

Для визначення біосумісності препаратів-пробіотиків з автохтонною мікробіотою необхідно проводити ряд досліджень для конкретного індивідуума, або ж розробляти аутопробіотики, що є досить складним процесом.

У зв'язку з цим, фахівці покладають великі надії на групу метаболітних про- і синбіотиків, які в порівнянні з клітинною формою більш стабільні при зберіганні, не знижують свою біологічну активність при застосуванні на тлі лікувального курсу антибіотиків, не спричиняють побічних дій на організм людини при гострих запальних процесах і хронічних захворюваннях, на відміну від живих мікроорганізмів, здатних в ряді випадків викликати або посилювати інфекційні та запальні процеси [60-64, 70. 71].

1.4.1. Основа метабіотика та механізм його дії.

Культуральна рідина – це продукт відходу в традиційній технології виробництва бактеріальних препаратів або концентратів. Вона містить в собі метаболітні продукти життєдіяльності пробіотичних бактері і може бути використана, як основа безклітинної форми пробіотика. Її утилізація, як відходу виробництва, призводить до значних економічних втрат і до забруднення навколишнього середовища. Тому розробка і виробництво безклітинних пробіотиків є одним з етапів створення безвідходного або

маловідходного виробництва бактеріальних препаратів - це напрямок є інноваційним[69, 72].

В одному з експериментальних досліджень, яке присвячене вивченню впливу супернатанту культуральної рідини лактобацил і біфідобактерій і їх інактивованої клітинної форми виявлено, що вони володіють різною швидкістю відновлення кишкового мікробіоценозу. Інактивовані пробіотичні бактерії не зменшували ступінь вираженості дисбіотичних змін в товстій кишці. І тільки надосадова рідина покращувала стан мікробіоценозу практично за всіма показниками [73].

Це свідчить, що ефективність пробіотичних препаратів зумовлена продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, тобто екзометаболітами. У зв'язку з цим, актуальним завданням біотехнології є розробка технологій виділення з безклітинних фільтратів або супернатантів біологічно активних екзометаболітів для створення пробіотиків метаболітного типу.

На українському фармацевтичному ринку пробіотики метаболітного типу представлені відомим препаратом «Хілак форте». Він містить беззародковий водний субстрат продуктів обміну речовин *Escherichia coli* DSM 4087, *Streptococcus faecalis* DSM 4086, *Lactobacillus acidophilus* DSM 4149, *Lactobacillus helveticus* DSM 4183 і допоміжні речовини. [74].

Застосування метаболітних пробіотиків є свого роду замісною терапією, яка здатна оптимізувати екологічні умови в ШКТ для розвитку власної мікробіоти господаря. При цьому відновлення кишкового мікробіома, на відміну від використання натальних пробіотиків, відбувається природним шляхом у зв'язку тим, що стимулюється власна мікробіота організму і вирішуються питання виживання пробіотичний мікроорганізмів і їх надходження в достатній кількості в товстий кишечник в умовах кислого середовища ШКТ. Така терапія високофізіологічна, оскільки здійснюється регулюючий вплив симбіотичних відносин господаря і його мікробіома, крім того практично зводить до мінімуму можливість побічних ефектів від проведеного лікування. Тому препарати, що діють на основі стимуляції росту

кишкової мікробіоти організму господаря (в основному біфідо- і лактобактерій), справедливо можна віднести до засобів нового покоління для корекції та підтримки мікробіома ШКТ, що реалізує свій вплив через власну мікробіоту організму людини [75, 76].

На жаль, в Україні корекція і відновлення мікробіоти ШТК метаболітними засобами ще тільки починаються. Це пов'язано з тим, що на фармацевтичному ринку представлена незначна кількість подібної форми препарату, а також лікарі та населення погано інформовані про практичну цінність метабіотиків. Такі дані можна знайти тільки в науковій літературі.

1.4.2. Джерела низькомолекулярних біологічно активних речовин.

Метабіотики є структурними компонентами пробіотичних бактерій, їх метаболітами чи сигнальними молекулами з відомою хімічною структурою. Вони можуть впливати на мікробіом, метаболітичні і сигнальні реакції людини, через оптимізацію складу і функцій мікробіоти, фізіології людини, через її імунітет і нейрогормональні механізми, метаболізм. [70, 77].

Різні пробіотичні штами можуть стати джерелом сотень низькомолекулярних біологічно активних речовин (НБАВ): бактеріоцинів (і інших антимікробних речовин), коротколанцюгових жирних кислот, інших органічних кислот, біосурфактантів, полісахаридів, пептидогліканів, тейхоевих кислот, ліпо- і глікопротеїдів, вітамінів, антиоксидантів, нуклеїнових кислот, різних білків, ферментів і лектинів, пептидів різної активності, амінокислот, факторів росту і коагуляції, захисних речовин і їх індукторів в клітинах людини, сигнальних молекул, плазмалогенів, кофакторів [78-86].

Пробіотичний метаболіт при взаємодії з бактеріальними і людськими клітинами-мішенями може впливати на генетичні, епігенетичні, фізіологічні, біохімічні реакції, а також внутрішньоклітинний і міжклітинний обмін інформацією. Деякі коменсали, у тому числі пробіотики, можуть виділяти ряд сигнальних молекул, що модифікують міжклітинні сигнали бактерій

(почуття кворуму) та пригнічувати експресію генів вірулентності у патогенних штамів, або стимулювати зростання корисних бактерій мікробіоти [70, 77].

Серед мікробних метаболітів особливу увагу приділяють коротколанцюговим летючим жирним кислотам (КЛЖК), які в основному представлені молочною, оцтовою, пропіоновою, масляною кислотами. Встановлено, що КЛЖК виконують в організмі ряд важливих функцій. До їх числа відносять енергетичну підтримку, стимуляцію функцій непатогенної симбіотичної мікробіоти, протизапальну та бактеріостатичну активність щодо патогенної мікробіоти, підтримання необхідних значень рН в кишечнику, регуляцію водно-іонного обміну, системи місцевого імунітету (sIgA) і ряду інших систем. При патологічних станах відбувається або значна елімінація цих сполук, або порушення їх фізіологічного рівня [71, 86, 87].

НБАВ. Ці групи НБАВ, виділені з симбіотичних чи пробіотичних мікроорганізмів або їх культуральної рідини, можуть використовуватися для виробництва харчових добавок, харчових продуктів і лікарських препаратів з метою профілактики і лікування хронічних захворювань людини [69, 88-93].

Розробка безклітинного пробіотика дозволяє використовувати різні штами, які присутні в кишковій мікробіоті людини. Метою дисертаційної роботи є розробка технології безвідходного виробництва при створенні синбіотичних біологічно активних добавок як на основі клітинної форми пробіотика, так і на основі безклітинного пробіотика, тому запропоновано використовувати такі роди бактерій: *Bifidobacterium* *Propionibacterium*.

1.5. Пропіоновокислі бактерії та їх біологічні властивості.

Увага до класичних пропіоновокислих бактерій як до потенційних пробіотиків зумовлюється їх властивостями продукувати антибіотичні (пропіоніцини) та біфідогенні речовини різної природи. Ці унікальні мікроорганізми володіють імуномодуючими і антимуtagenними

властивостями, здатні знижувати генотоксичний вплив ряду хімічних сполук і УФ-променів.

1.5.1. Морфологічні та фізіологічні ознаки бактерій роду *Propionibacterium*

За таксономічним положенням пропіоновокислі бактерії (ПКБ) належать до наступних таксонів: Тип *Actinobacteria*; *Клас* *Actinobacteria*, *Подклас* *Actinobacteriae*; *Порядок* *Actinomycetales*; *Подпорядок* *Propionibacterineae*; *Семейство* *Propionibacteriaceae*; *Род* *Propionibacterium* [94].

Представник роду *Propionibacterium* мають кільцеву хромосому, розмір якої варіює в межах 2,3 - 3,2 Мб в залежності від виду. Вмісту Г + Ц (гуанін + цитозин) в ДНК ПКБ варіюють у межах 53 - 68 мол %. [95], що робить їх більш близькими до типів *Carynobacteria* і *Mycobacteria*, ніж до молочнокислим бактеріям [96].

Грунтуючись на локалізацію ПКБ, їх умовно поділяють на дві великі групи: молочнокислі (класичні) і шкірні. Класичні ПКБ зустрічаються в сирому молоці, сирах [96], в силосі, овочах, в шлунково-кишковому тракті людини, свиней, курей і в рубці жуйних тварин [97].

Класичні види ПКБ мають більш тривалу історію їх безпечного застосування в промислових біотехнологічних процесах, а саме, у якості стартерних культур при виробництві сирів [98, 99], отримання пропіонової кислоти та інших метаболітів [100, 101].

Пропіоновокислі бактерії грампозитивні, нерухомі, факультативно-анаеробні або аеротолерантні паличкоподібні бактерії розміром 0,5 - 1,5 мкм, не утворюють спор, утворюють каталазу. Зазвичай плеоморфні, діфтероїдні або булавоподібні з одним заокругленим, іншим - конусоподібним або загостреним кінцем. Клітини в молодих культурах виглядають як викривлені, злегка зігнуті палички. Клітини у старих

культурах мають вигляд кокковидної форми. Розташування клітин: поодинокі чи попарні, у вигляді коротких ланцюжків, V- або Y-формах, можуть набувати форми «китайських ієрогліфів». Більшість культур краще росте в анаеробних умовах. Зброджують вуглеводи, лактати, пірувати з утворенням пропіонової і оцтової кислот, невеликої кількості ізовалеріанової, мурашиної, бурштинової або молочної кислот, CO₂, а також цитрату у присутності лактатів. Більш сприятливі у якості джерела енергії, ПКБ краще використовують лактат і глюкозу, ніж лактозу. Основні продукти ферментації лактату приведені у рівнянні:



ПКБ ферментують аланін, серин, аспарагін і гліцин з утворенням вуглекислого газу, аміаку, оцтової і пропіонової кислоти. Співвідношення кількості пропіонової кислоти до оцтової зазвичай дорівнює 2: 1, проте така пропорція може змінюється в широких межах і може досягати 5: 1. Співвідношення пропіонової і оцтової кислот залежить від складу та властивостей середовища та зовнішніх умов існування мікроорганізмів. У присутності лактози продукування пропіонової кислоти відбувається більш енергійно, ніж у присутності глюкози. [94, 97].

Швидкий розвиток та нагромадження біомаси пропіоновокислих бактерій відбувається за наступного діапазону температур 30 - 37 ° C і нейтрального значення активної кислотності pH 7,0. Більшість штамів зростає в глюкозній бульйоні з 20% жовчі. Колонії можуть бути білими, сірими, рожевими, червоними, жовтими, помаранчевими. При зростанні в рідкому середовищі деякі штами утворюють важкий тягучий осад. Непатогенні, мешкають в шлунково-кишковому тракті людини, свиней, курей і в рубці жуйних тварин, в молочних продуктах (в твердих сичужних сирах) [27, 101,].

У ШКТ здорових дорослих людей ПКБ присутні у кількості не менше $1 \cdot 10^5$ КОЕ/см³ фекалій. У процесі свого метаболізму ПКБ продукують такі важливі для організму людини речовини, як вітамін B₁₂ і фолієву кислоту,

амінокислоти, ферменти, коротколанцюгові жирні кислоти. Основним продуктом життєдіяльності ПКБ є пропіонова кислота [17].

Пропіонова кислота - це коротколанцюгова жирна кислота, яка транспортується в печінку і включається в процес глікогенезу та синтезу біогенних амінів, покращує мікроциркуляцію в слизовій оболонці кишечника і підтримує в ній метаболічні процеси, блокує прикріплення до колоноцитами умовно-патогенної мікробіоти, служить промотором зростання анаеробних бактерій нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту [27, 102, 103].

1.5.2. Пробіотичні властивості пропіоновокислих бактерій.

У сучасних джерелах наукової літератури представлено достатньо фактичних даних, які свідчать про наявність пробіотичних властивостей у ПКБ, як в монокультурі так і в консорціумі. ПКБ стійкі до дії жовчних кислот і витримують низьке значення активної кислотності шлунку (pH 2.0). Класичні ПКБ здатні до біосинтезу нутрицевтиків (вітамінів B2, B7, B9, B12, K, кон'югованої ліноленової кислоти) [27, 103, 104]. Їх оздоровчі ефекти можуть бути пов'язані з наступними моделями впливу: вплив на склад кишкової мікробіоти, за винятком патогенів; модуляція метаболічної активності мікробіоти господаря; імунomodуляція [18, 97, 105].

ПКБ відомі антимуtagenної дією. Антимутагени ПКБ підвищують активність ферментних систем, які беруть участь у детоксикації, впливаючи на окислювально-відновний потенціал організму. Ці процеси призводять до зниження мутацій [98, 104].

Важливу роль в організмі відіграють антиокислювальні ферменти. Ферменти супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза, які синтезовані ПКБ, утворюють антиоксидантний пару, яка знешкоджує вільні радикали кисню. Ці ферменти запобігають запуску процесу ланцюгового окислення, а глутатіонпероксидаза знешкоджує ліпідні перекиси [98].

ПКБ є продуцентами ростових біфідогенний стимуляторів (РБС), які володіють пребіотичними ефектами. У дослідження [106]. виявлено, що концентрація РБС коливається у межах від 0,1 мкг / л до 1 мкг / л. Такі штами ПКБ як *P. freudenreichii* ET-3, *P. shermanii* PZ-3, *P. acidipropionici* JCM 6432, *Propionibacterium jensenii* JCM 6433 продукують РБС у кількості 4–23 мг/л в анаеробних умовах культивування. При використанні методу високо ефективною рідинної хроматографії, встановлено, що більше 70 % від загального вмісту РБС складають 1,4-дигідрокси-2-нафтоїнова кислота (DHNA) [27] і 2-аміно-3-карбокси-1,4-нафтохінон (ACNQ) [107]

Фільтрат культуральної рідини ПКБ наділений селективним стимулюючим ефектом росту біфідобактерій [108, 109]. Біфідогенний ефект пребіотиків вуглеводної природи пов'язаний зі стимуляцією росту пробіотичних мікроорганізмів, шляхом збагачення живильного середовища джерелом вуглецю. Проте механізм стимулювання росту біфідобактерій, зазначених вище РБС, принципово відрізняється від пребіотиків вуглеводної природи. ACNQ стимулює зростання біфідобактерій як акцептор електронів при відновленні NAD + [9, 110]. Відновлення NAD + вважають відповідальним за здатність ПКБ стимулювати розвиток культур біфідобактерій за допомогою DHNA і ACNQ. При метаболізмі глюкози біфідобактерій в присутності ACNQ і Fe (CN) 63-, NAD (P) H в клітинах окислюється ACNQ за допомогою активності діафори, а окислений ACNQ подає електрон на Fe (CN) 63-. Екзогенне окислення NADH системою ACNQ/Fe (CN) 63- призводить до генерації пірувату і зменшення виробництва лактату. DHNA є попередником менахінон (вітамін K2) (рис 1.) та є більш сильним стимулятором росту біфідобактерій, ніж ACNQ.

На рисунку 1 представлені гліколітичні шляхи біфідобактерій та запропоновані реакції для системи 2-аміно-3-карбокси-1,4-нафтохінон (ACNQ) - медіатор Fe (CN).

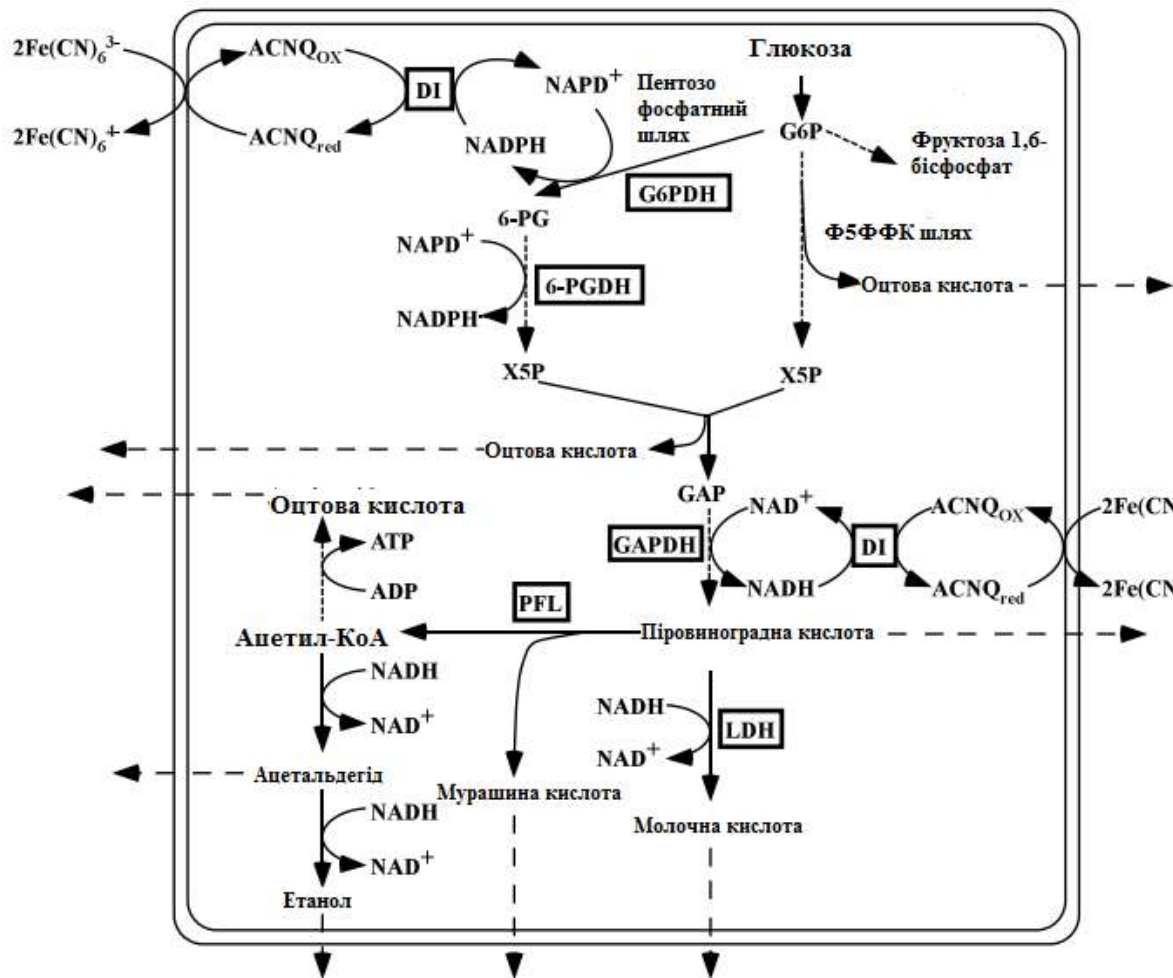


Рис. 1. Гліколітичні шляхи біфідобактерій: X5P – ксилолоза-5-фосфат; GAP – гліцеральдегід 3-фосфат; 6-PG – 6-фосфоглуконат; DI – діафораза; G6PDH – глюкоза-6-фосфатдегідрогеназа; 6-PGDH – 6-фосфоглуконатдегідрогеназа; GAPDH – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; PFL-піруват-форміат-ліаза [108].

Примітка. Суцільна лінія вказує на етап, який каталізується одним ферментом, а пунктирна лінія означає етап, що каталізується більш ніж двома ферментами.

Різні дослідження описують можливість ПКБ зв'язувати і видаляти з ЖКТ і харчових продуктів: афлатоксин В, токсини *Fusarium* sp., ціанотоксини і деякі важкі метали, такі як мідь і кадмій. Вони також інгібують активність п-глюкуронідази та нітроредуктази. Це ферменти, які утворюються кишкової

мікробіотою та приймають участь в утворенні мутагенів, канцерогенів і промоторів зростання пухлин [98, 104].

Непатогенні види ПКБ утворюють ряд білкових бактеріоцинів. Види *P. thoenii* и *P. jensenii* утворюють термостійкі білки, які інгібують низку грамнегативних і грампозитивних бактерій, дріжджів і пліснявих грибів [97, 104]. Експериментальні та клінічні випробування препаратів на основі ПКБ показали імуномодулюючу, антивірусну активність в клінічних дослідженнях, що пов'язують з активацією моноцитмакрофагової системи, індукцією синтезу інтерферону і активацією кілерних клітин [104, 111].

Всі вище перераховані властивості ПКБ дозволяють застосовувати їх не тільки для конструювання ефективного біокоректора на основі клітинної форми, але і для створення пробіотиків п'ятого покоління на основі екзометаболітів, здатних здійснювати позитивний вплив як на мікробіоту ШКТ, так і на загальний мікроекологічний стан людини.

1.6. Характеристика представників роду *Bifidobacterium*

Однією з найважливіших груп коменсалів людини є бактерії роду *Bifidobacterium*, які здійснюють позитивний вплив на ШКТ дітей і дорослих людей і.

Біфідобактерії - рід грампозитивних анаеробних бактерій, які не утворюють спор, мають форму трохи зігнутих паличок довжиною 2-5 мкм. Розташування клітин поодинокі, парами, іноді ланцюжками або розетками. Біфідобактерії в процесі життєдіяльності виробляють ряд органічних кислот. В основному, це оцтова і молочна кислоти (в молярному відношенні 3: 2), а також мурашина і бурштинова [112].

Для створення продуктів лікувально-профілактичного призначення велика увага приділяється бактеріям роду *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* як основним представникам нормальної мікробіоти ШКТ. Широке застосування у виробництві ферментованих продуктів отримали біфідобактерії видів:

Bifidobacterium bifidum, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* [113].

Bifidobacterium bifidum, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, в цілому досягають 10^8 — 10^{11} КУО/см³ [114, 115].

При виборі штамів біфідобактерій велику увагу приділяють оптичним характеристикам молочної кислоти. Перевага віддається штамам, які утворюють L (+) форму, як найбільш фізіологічний для людського організму або суміш обох ізомерів (D і L).

Відібрані штами біфідобактерій повинні бути стійкими до дії антибіотиків, бактеріофагів, NaCl, лужного середовища, жовчі і фенолу. З технологічної точки зору, важливими ознаками для вибору промислового штаму є наступні показники: швидкість і межі кислотоутворення, органолептичні показники і протеолітична активність. Для виробництва сухих бактеріальних продуктів особливу увагу приділяють вивченню стійкості штамів біфідобактерій до підвищеної температури. Пробіотичні штами біфідобактерій повинні проявляти антагоністичну активність до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, мати високу адгезивну здатність до клітин кишкового епітелію [116-120].

Продукція біфідобактеріями лізоциму, бактеріоцинів, спиртів і висока антагоністична активність по відношенню до різних патогенів перешкоджають їх проникненню в верхні відділи шлунково-кишкового тракту. Антагоністична активність біфідобактерій пов'язана не тільки з продукцією органічних кислот і бактеріоцинів з широким спектром антимікробної дії, а також зі здатністю блокувати рецептори на епітелії слизової оболонки товстої кишки, завдяки чому запобігають фіксації на них потенційно небезпечних мікроорганізмів [115, 120].

Біфідобактерії відрізняються високою здатністю до синтезу амінокислот, білків, багатьох вітамінів групи B, які всмоктуються в кишечнику. Вони сприяють процесам ферментативного перетравлення їжі, тому що підсилюють гідроліз білків, зброджують вуглеводи, обмилюють

жири, розчиняють клітковину, стимулюють перистальтику кишечника, сприяють нормальній евакуації кишкового вмісту [120-122]. Тому при стійких, тяжких порушеннях функцій біфідобактерій може розвиватися комплекс білково-вітамінно-мінеральної недостатності. При зниженні рівня біфідобактерій зникає колонізаційна резистентність мікробіоценозу кишечника, відбувається транслокація патогенів в верхні відділи ШКТ і їх надмірний ріст.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

Узагальнюючи дані науково-технічної літератури, слід зазначити, що при недостатньому споживанні есенціальних нутрієнтів у складі БАД на тлі незбалансованого харчування та антибіотикотерапії, виникають дисбіотичні порушення шлунково-кишкового тракту людини, які здатні за наявності патологій перетікати в хронічні захворювання ШКТ.

Сьогодні для запобігання дисбактеріозів і підтримки якісного та кількісного складу нормальної мікробіоти ШКТ людини пропонується широкий арсенал біопрепаратів. Одним з перспективних і маловивчених напрямів є технологія створення БАД з використанням метабіотиків. Оскільки основою безклітинного пробіотика є культуральна рідина, концепція метабіотиків вперше робить можливим організувати безвідходне виробництво при виготовленні класичних пробіотиків,

Незважаючи на велику різноманітність препаратів-пробіотиків і популярність пробіотичних мікроорганізмів для їх створення, необхідно приділити більшу увагу бактеріям роду *Propionibacterium*. Пропіоновокислі бактерії здатні надавати ряд позитивних впливів на мікроекологічними статус людини, а їх метаболіт має ростовими факторами для росту біфідобактерій. Тому розробка біотехнології БАД з включенням як клітинної форми пропіоновокислих бактерій, так і їх метаболічної безклітинної форми є актуальним і інноваційним питанням

.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журн. микробиология. 2004. №1. С. 84–92.
2. Бондаренко В. М., Грачева Н. М., Мацулевич Т. В. Дисбактериозы кишечника у взрослых. КМК Scientific Press, 2003. 224 с.
3. Свириденко Ю.Я., Мордвинова Ю.Я. Инновационные разработки в области сыроделия // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 3. С. 17–19.
4. Капрельянц Л. В. Пребиотики: химия, технология, применение Киев: ЭнтерПринт, 2015. 252 с.
5. FAO/WHO. Join FAO/WHO Working group Guidelines for the Evolutions of Probiotics in Foods // London. Ontario. Canada. 2002.
6. Ринчингийн Эрдэнэтуяа. Разработка технологии ферментированных сывороточных напитков: автореф. дис. ... канд. тех. наук. 05.18.07: защита 03.02.2006 / науч. рук. Хамагаева И.С. Улан-Удэ ВСГТУ, 2005. 24 с.
7. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic/ Hill C. et al. // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014. V. 11. P. 506–514
8. Sullivan A., Nord C. The place of probiotic in human intestinal infections // Intern J. of Antimicrobial Agents. 2002. №20. P.313–319
9. Probiotics and its functionally valuable products—A review/ Kanmani P. et al. //Critical reviews in food science and nutrition. 2013. V. 53. №. 6. P. 641–658.
10. Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage/ Lollo P. C. B. et al. // Food research international. 2013. V. 54. №. 1. P. 118–124.
11. Yerlikaya O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks //Food Science and Technology (Campinas). 2014. V. 34. №. 2. P. 221–229.

12. Плетнева Н.Б., Рожков А.В. Пропионовокислые бактерии – основное действующее начало симбиотической закваски “Эвита” / Матер. наuchнотехн. конф. Симферополь, 2001. С. 101.

13. Крисенко О.В., Скляр Т.В., Вінніков А.І. Мікробіологічні аспекти пробіотичних препаратів // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. 2010. Т. 2, вип. 18. С. 25–33.

14. Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes / Lyra A. et al. // BMC Gastroenterol. 2010. V. 10. P. 110-115.

15. Production Of functional probiotic, prebiotic and synbiotic ice creams / Di Criscio T. et al. // J. Dairy Sci. 2010. V. 93, № 10. P. 4555–4564.

16. Survival Of Lactobacillus rhamnosus Strains in the upper gastrointestinal tract / Pitino I. et al. // Food Microbiol. 2010. V. 27, № 8. P. 1121–1127.

17. Янковский Д.С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека // Здоровье женщины. 2003. № 4(16). С. 150-157.

18. Бережной В.В., Крамарев, С.А., Мартынюк, В.Ю. Микроэкологические нарушения у детей и современные возможности повышения эффективности их коррекции //Здоровье женщины. 2002. Т. 4, №. 12. С. 79-92.

19. Дідух Н.А., Чагаровський О.П., Лисогор Т.А. Заквашувальні композиції для виробництва молочних продуктів функціонального призначення Одеса: Видавництво «Поліграф», 2008. 236 с. – ISBN 978-966-8788- 79-6.

20. Крижак Л. М. Обґрунтування складу заквашувальної композиції для виробництва йогурту функціонального призначення. // Харчова наука і технологія. 2015. № 2 (31). С. 7–14.

21. Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli / Minervini F. et al // Journal of dairy science. 2012. V. 95, №. 2. P. 508–520.

22. Капустян А.І., Черно Н.К. Перспективи використання біологічно активних бактеріальних гідролізатів для нутрітивної підтримки населення з розладами імунної системи // Харчова наука і технологія. 2015. №2(31). С. 18-25.
23. Мосієнко В.С., Мосієнко М.Д., Рябуха В.М. Молочнокислі бактерії, їх властивості та використання в медичній практиці // Укр. хіміотерап. ж. 2002. № 11(13). С. 16–23.
24. К вопросу разработки пробиотических препаратов из культуральной жидкости лактобактерий / Несчисляев В.А. и др. // Клиническое питание. 2007. № 1(2). – С. 50–55.
25. Использование послеспиртовой барды для культивирования молочнокислых и пропионовокислых бактерий / Шутова В.В. и др. // Біотехнологія. 2010. Т.3, №6. С. 68-74
26. Воробьева, Л.И. Пропионовокислые бактерии. М.: Изд-во МГУ, 1995. 288 с.
27. Karimi R., Mortazavian A. M., Karami M. Incorporation of *Lactobacillus casei* in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl // Journal of dairy science. 2012. V. 95, №. 8. P. 4209–4222.
28. Michael de Vrese, J. Schrezenmeir. Probiotics, prebiotics and synbiotics // Food Biotechnology: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2008. V. 111. P. 1–66.
29. Nutraceutical production by *Propionibacteria* / J. Hugenholtz et al // Lait. 2002. Vol. 82. P. 103–112.
30. Oelschlaeger T. Mechanisms of probiotic action. A review // Int. J. Med. Microbiol. 2010. № 300. P. 57-62.
31. Yeo S.K., Ooi L.G., Lim T.J. Antihypertensive Properties of Plant-Based prebiotic: School of industrial Technology, Universiti Sains Malasia, 11800 Penang: Malasia. 2013. P.78-82.

32. Catalytic properties of β -cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. B1-12 and intermolecular transglycosylation of stevioside // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2007. № 1. P. 207-212.

33. Chen M., Wang X., Zhang I. Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. № 8. P. 1533-1537.

34. Ohur T, Ozaki Y., Vikuni K. Long-term ingestion of lactosucrose increase *Bifidobacterium* sp. In human fecal flora // *PubMed.* 2012. V. 5. P. 45-56.

35. Playne M.J., Crittenden R. Commercially available oligosaccharides // *Bull. Ind. Dairy Fed.* 1996. V. 313. P. 10–22.

36. Bengmark, S. Colonic food: pre- and probiotics // *Am J Gastroenterol.* 2000. № 95. P.5–7.

37. Капрелянц Л.В., Юргачова К.Г. Функціональні продукти // Одеса: Друк, 2003. 312 с.

38. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin // *J Nutr.* 1999. №7. P. 38–41.

39. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin [Text] / Gibson G.R. et. al // *Am J Clin Nutr.* 1997. № 65. P. 397–402.

40. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons / Kleesen B. et. al // *Am J Clin Nutr.* 1997. № 25. P. 325–329.

41. Zidi, S. H. Lactulose reduces intracolonic acetaldehyde concentration and ethanol elimination rate in rats / Zidi S.H. et. al // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2003. V. 27, № 9. P. 59–62.

42. Protection of probiotic microorganisms by microencapsulation / T. Petrovic, et al. // *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly.* 2007. V. 13, №. 3. P. 169-174.

43. MacGillivray P.C., Finlay H.V., Binnes T.B. Use of lactulose to create a preponderance of lactobacilli in the intestine of bottle-fed infants // *Scott Med J.* 1959. № 4. P. 182-189.
44. Харитонов В.Д., Филатов Ю.И., Мищенко Д.С. Лактулоза. Назначение и использование // *Молочная промышленность.* 2000. № 7. С. 16-19.
45. Грибакин С.Г. Лактулоза в детском питании: пребиотик “со стажем” // *Вопр. детской диетологии.* 2003. Т. 1, № 4. С. 46-52.
46. Бельмер С.В. Лечение запоров у детей первых лет жизни препаратами лактулозы // *Детский доктор.* 2001. № 1. С. 46 -48.
49. Schrezenmeir J., M. de Vrese. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition // *Am. J.Clin.Nutr.* 2001. № 2. P. 361-364.
50. Ходаева Н.В. Новое поколение биопродуктов, или что такое синбиотики? // *Молочная промышл.* 2002. № 12. С.30.
51. Roberfroid M.B. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties // *Br. J. Nutr.* 1998. № 4. P. 197-202.
52. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: dietary approaches for the modulation of microbial ecology // *Am. J. Clin. Nutr.* 1999. № 5. P. 1052-1057.
53. Minelli E.B., Benini A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects // *Microb Ecol Health Dis.* 2008. V. 20. P. 180-183.
54. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities / Reid G. et al. // *Nature Reviews Microbiology.* 2011. V. 9, №. 1. P. 27-38.
55. Structural bacterial molecules as potential candidates for an evolution of the classical concept of probiotics / Caselli M et al. // *Adv. Nutr.* 2011. V. 2. P. 372-376.
56. Исследование ауто-, изои гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл / Глушанова Н. А. и др // *Бюллетень Восточно-*

Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2005. №. 6. (44) С. 138-142

57. Should long-term prophylactic use of probiotics for infants and young children give cause for concern? / Yazdankhah S.P. et al // *Microb. Ecol. Health. Dis.* 2008. V. 20. 171–176.

58. Nicholson J.K., Holmes E., Wilson I.D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. V. 3. P. 431–438.

59. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism / Clayton T.A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106, №34. P. 14728–33.

60. Effects of *Lactobacillus* GG on gene expression pattern in small bowel mucosa / Di Caro S et al. // *Dig. Liver. Dis.* 2005. V. 37. P. 320–9.

61. Analysis of host-inducing proteome changes in *Bifidobacterium longum* NCC2705 grown in vivo / Yuan J. et al. // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. P. 375-85.

62. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice / Bron P.A. et al // *J. Bacteriol.* 2004. Vo. 186. P. 5721–9.

63. De Vries MC. Analyzing global gene expression of *Lactobacillus plantarum* in the human gastro-intestinal tract. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, Thesis, 2006.

64. Effects of *Lactobacillus plantarum* of genes expression pattern in mice jejunal Peyer's patches / Chang G. et al // *Cell Immunol.* 2009. V. 258. P. 1–8.

65. Safety Demonstration of Microbial Food Cultures in Fermented Food Products / Bourdichon F. et al. // *Bulletin of the International Dairy Federation* 455, 2012. P. 7–8

66. Goldfine H. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution // *Prog. Lipid Res.* 2010. V. 49. P.493–8.

67. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces / Osipov G.A. et al. // Microb. Ecol. Health. Dis. 2009. V. 21. P. 159–71

68. Семенов А. В. Характеристика отношений между пробиотическими и автохтонными микроорганизмами и алгоритм индивидуального подбора пробиотиков // Казанский медицинский журнал. 2011. Т. 92, № 6/. С. 792-795

69. Krupyt'ska L.O., Kaprelyants L.V., Trufkti L.V. Investigation of the antagonistic activity of secondary metabolites of propionic acid bacteria // Харчова наука та технологія. 2017. Т. 11, № 2. 16–20

70. Sonnenburg J.L., Fischbach M.A. Community Health care: therapeutic opportunities in the human microbiome // Sci Transl Med, 2011 Apr 13; 3(78): 78ps12. doi: 10.1126/scitranslmed.3001626.

71. The role of probiotics and natural bioactive compounds in modulation of the common molecular pathways in pathogenesis of atherosclerosis and cancer / Bomba A. et al. // Biologia. 2012. V. 67. P. 1–13.

72. Провоторова О.В. Технология производства и оценка эффективности синбиотиков на основе бесклеточных пробиотиков метаболитного типа: дисс... канд. техн. наук: 03.01.06: защита 13.03.2013 / науч. рук. Неминущая Л.А. Щелково: РАСХН, 2013. 172 с.

73. Урсова Н.И. Актуальные и нерешенные проблемы пробиотикотерапии // Лечащий врач. 2013. №. 8.: <http://www.medicusamicus.com/?action=1x3007x1>

76. Пробиотики: вектор развития / Чичерин И. Ю. и др. // Практическая медицина. 2012. Т. 3. С. 180-188.

74. Клинико-лабораторная эффективность пробиотика метаболического типа Хилак-форте при острых кишечных инфекциях у детей / Мазанкова Л.Н. и др. // Consilium medicum. Педиатрия (приложение 2). 2004. Т.6, № 32. С. 34-38.

75. Мазанкова Л. Н., Ильина Н. О., Бегиашвили Л. В. Метаболические эффекты пробиотической терапии при вирусных диареях у детей // РМЖ. 2010. Т. 18. №. 20. С. 1232-123
76. Пробиотики: вектор развития / Чичерин И.Ю. и др. // Практическая медицина. 2012. Т. 3. С.180-188.
77. Anders M.E., Marco M.L. Food formats for effective delivery of probiotics //Ann Rev Food Sci Technol. 2010. V. 1. P. 65-85.
78. Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease / Holmes E. et al. // Trends Micobiol. 2011. V. 19. P. 349-59.
79. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities / Reid G. et al. // Nat. Rev. Microb. 2011. V. 9, №1. P. 27-38.
80. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora / Eckburg P.B.et al. // Science. 2005. V. 308. P. 1635–8.
81. Shenderov B.A. OMIC technologies and their importance in the modern prophylactic and regenerative medicine // Regenerative Med J. 2012. V. 3. P. 70-78.
82. Van Reenen C.A., Dicks L.M.T. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review // Arch Microbiol. 2011. V. 193. P. 157-68.
83. Cleavage of a model DNA replication fork by a methyl-specific endonuclease / Ishikawa K. et al. // Nucl Acids Res. 2011/ V. 39/ P. 5489-98.
84. Osipov G.A., Verkhovtseva N.V. Study of human microecology by mass-spectrometry of microbial markers // Benef Microbes. 2011. V. 2. P. 63-78.
85. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces / Osipov G.A. et al. // Microb. Ecol. Health Dis. 2009. V. 21. P. 159-71.
86. Goldfine H. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution // Prog. Lipid Res. 2010. V. 49. P. 493–8

87. Rohlke F., Surawicz C., Stollman N. Fecal flora reconstitution for recurrent *Clostridium difficile* infection: results and methodology // *J Clin Gastroenter.* 2010. V. 44. P. 567-70.

88. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В. Жирнокислотний склад біологічно активних добавок з включенням пропіоновокислих бактерій // *Вісник львівського університету. Серія біологічна.* 2016. Т. 73. С. 442–442.

89. Research into fatty acid composition of probiotic consortiums with the inclusion of propionic acid bacteria / Krupyt'ska L.O. et al. // *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies.* 2017. №. 3 (6). P. 15-20.

90. *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci / Li J. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. V. 108. P. 3360–3365.

91. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate / Fukuda S. et al. // *Nature.* 2011. V. 469. P. 543–547.

92. Structural bacteria of probiotics / Caselli M. et al. // *Adv Nutr.* 2011. V. 2. P. 372-376.

93. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaek S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 72. P. 728–764.

94. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Vos P. et al. (ed.). // Springer Science & Business Media, 2011. V. 3. 1599 p.

95. Gautier M., Mouchel N., Rouault A. Determination of genome size of four *Propionibacterium* species by pulsed-field gel electrophoresis // *Lait.* 1992. V. 72. P. 421-446.

96. Treatment of ulcerative colitis with milk whey culture with *Propionibacterium freudenreichii* / Mitsuyama K et al. // *J. Intest. Microbiol.* 2007. V. 21, № 2. P. 143-147.

97. Arganaraz M.E. Presencia de propionibacterias clásicas de potencial efecto probiótico en intestino de aves de consumo humano. // *Revista Chilena de Nutrición.* 2009. V. 36, № 1. P. 677-683.

98. Хамагаева И.С., Качалина Л.М., Тумурова С.М. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий: монография / Улан-Удэ : Изд- во ВСГТУ, 2006. 176 с.

99. Yerlikaya O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks //Food Science and Technology (Campinas). 2014. V. 34, № 2. P. 221-229.

100. Sullivan A., Nord C. The place of probiotic in human intestinal infections // Intern J. of Antimicrobial Agents. 2002. № 20. P. 313-319

101. Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие / авт.: Д.А. Новиков – Минск.: БГУ, 2014. 256 с.

102. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence / Cousin F.J. et al. // Dairy science & technology. 2011. V. 91, № 1. P. 1–26.

103. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. Внеклеточный белок пропионовокислых бактерий ингибирует индуцируемые мутации у штаммов *Salmonella typhimurium* // Микробиология. 2001. Т. 70, № 31. С. 39–44.

104. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / Hill C. et al. // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. V. 11. P. 506-514.

105. Плетнева Н.Б., Рожков А.В. Пропионовокислые бактерии – основное действующее начало симбиотической закваски “Эвита” / Матер. Научно-техн. конф.: Симферополь, 2001. С. 101-103.

106. Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains / Tomoaki Konya et al. // Journal of bioscience and bioengineering. 2007. V. 103, № 5. P. 464-471.

107. Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3, / Isawa K. et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66. P. 67-681

108. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii* / Thierry A. et al. // J. Food Microbiol. 2011. V. 149. P. 19–27.
109. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon / Hatakka K. et al. // International journal of food microbiology. 2008. V. 128, № 2. P. 406-410.
110. Kaneko T.A Novel bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. // Biosci. Microflora. 1999. V. 95, № 18. P. 73-80.
111. The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications / Falentin H. et al. // PloS One. 2010. V. 5. P. 11748-11753.
112. Степаненко П. П. Микробиология молока и молочных продуктов // Москва, 1999. С. 127.
113. Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z. Comparision of growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium Bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics // Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 2008. V. 7, №. 2. P. 5-20.
114. Семенихина В.Ф., Яркина Я.А. Питательная среда для биомассы бифидобактерий // Молочная промышленность. 2003. Т. 10. С. 26-27.
115. Chmielewska A., Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation // World journal of gastroenterology: WJG. 2010. V. 16, №. 1. P. 69-75.
116. Guerra P. V. P. et al. Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial // World journal of gastroenterology: WJG. 2011. V. 17, №. 34. P. 3916-3921.
117. Hadadji M., Bensoltane A. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk // African Journal of Biotechnology. 2006. V. 5, №. 6. P. 505-509.

118. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota / Turrone F. et al. // PloS one. 2012. V. 7, № 5. P. e36957.
119. Bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits / Picard C. et al. // Alimentary pharmacology & therapeutics. 2005. V. 22, №. 6. P. 495-512.
120. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate / Fukuda S. et al. // Nature. 2011.V. 469,№. 7331. P. 543.
121. Effect of skim milk-alginate beads on survival rate of bifidobacteria / Yu W. K. et al. // Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2001. V. 6, №. 2. P. 133-138.
122. Баснакьян И.А., Мельникова В.А. Голодание бактерий. Стресс, обусловленный лимитом субстрата // Ж. микробиол., эпидимиол., и иммунобиол. 2001. №.1. С. 99-103.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Схема проведення досліджень

Основні напрями досліджень, послідовність і взаємозв'язок розробки технології синбіотичних біологічно активних добавок відображені в структурній схемі, представлений на рис. 2.1.

Першим етапом дисертаційної роботи був аналіз літературних джерел; патентний пошук; інтернет скрінінг. Це допомогло встановити мету роботи та методи її досягнення.

Наступний етап – експериментальний, який полягав у підборі оптимальних поживних середовищ культивування мікроорганізмів; пошуку основних режимів сумісного культивування; дослідженні вторинних метаболітів у культуральній рідині та її вплив на основних представників ШКТ бактерій роду, отримання синбіотика з включенням як клітинної, так і бесклітинної форм; дослідження основних мікробіологічних та фізико-хімічних показників отриманих продуктів; визначенні якісних змін продуктів в процесі зберігання.

На завершальному етапі проводили розробку технологічних схем отримання функціональних продуктів і промислову апробацію, а також нормативної документації з отримання продуктів та розрахунок собівартості і економічної ефективності розробленої технології.

Результатом проведеної роботи слугувала розробка біологічно активних добавок з метою корекції та підтримання кількісного та якісного складу мікробіоти шлунково-кишкового тракту (ШКТ).

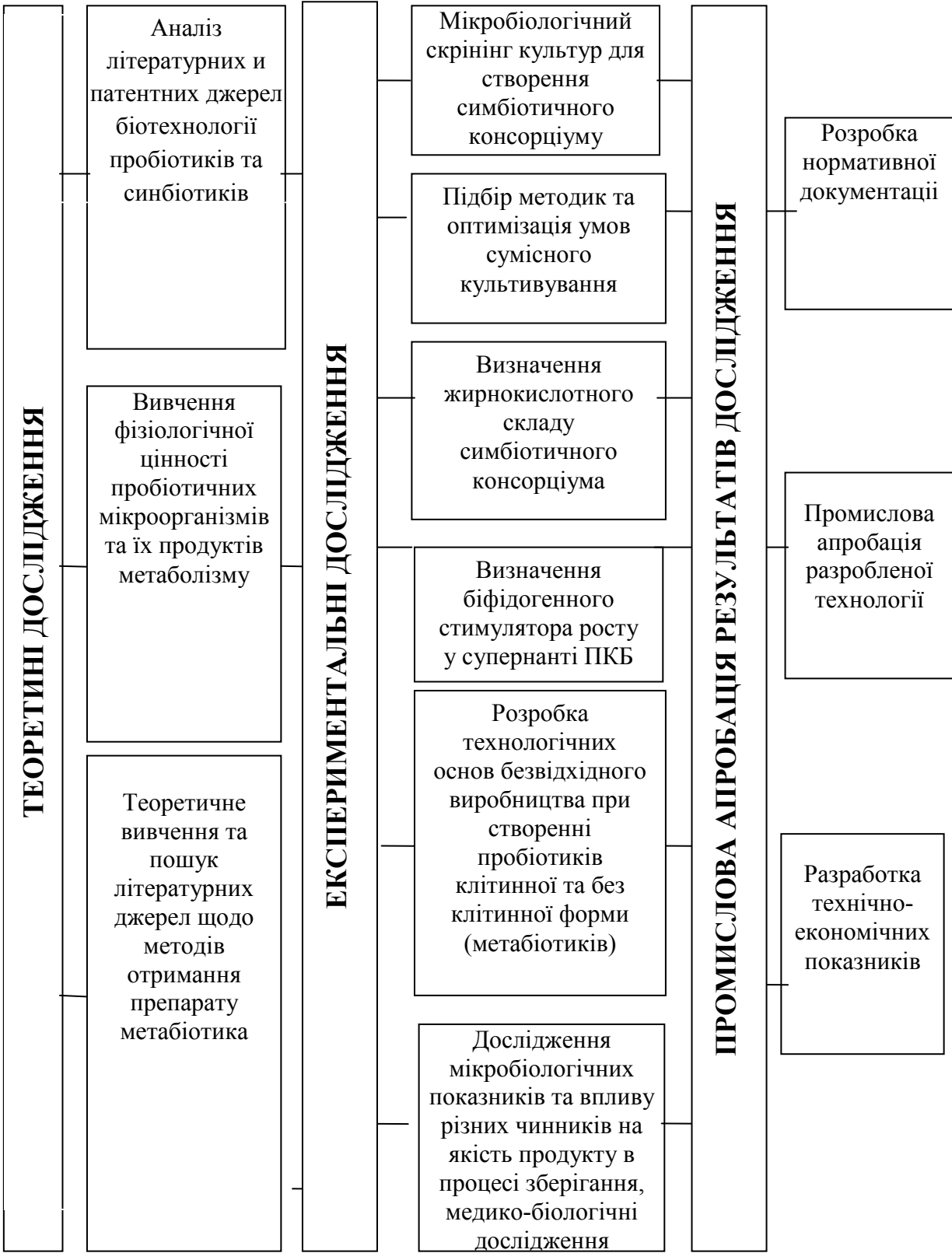


Рис. 2.1 Основні напрямки проведених досліджень

2.2 Сировина та препарати, що використовували в дослідях

При проведенні експериментальних досліджень у якості сировини і складових компонентів використовували культури з музею кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування ОНАХТ *Bifidobacterium longum* - ЯЗ, *Bifidobacterium adolescentis* - C52, *Bifidobacterium bifidum* - 1, *Propionibacterium shermanii* - 4. Культивування проводили на лактозному середовищі з додаванням соєвої сироватки (молочно сироватка; пептон; цитрат натрію; калій; натрій фосфорнокислий; аскорбінова кислота; соєвої сироватки; вода).

2.3 Організація та методи досліджень

Основна частина досліджень була проведена в лабораторіях кафедри біохімії і мікробіології ОНАХТ, окремі дослідження виконувалися на базі Фізико-хімічного інституту імені А.В. Богатського НАН України, на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова; в Одеському селекційно-генетичному інституті. Промислову апробацію дослідних партій біологічно активних добавок (БАД) проводили на підприємстві ТОВ НВО «Аріадна».

Характеристика мікробіологічні, біохімічних, хімічних методів досліджень відповідно до напрямів експериментів, що проводилися наведено в таб. 2.1. Оригінальні методики докладніше викладені нижче

2.3.1. Культивування бактерій роду *Bifidobacterium*.

Культивування біфідобактерій проводили на зазначених поживних середовищах: кукурудзяно-лактозне середовище, MRS-бульйон, лактозне середовище з додаванням соєвої сироватки. Склад поживних середовищ зазначений у таблиці 2.2. Термостатування проводили при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, протягом 24 годин.

Таблиця 2.1

Методи досліджень, що використовували про проведенні
експериментів

№	Показатели и методы исследований	Принцип метода, специфика	Джерело
1	2	3	4
1	Кількість КУО/см ³ життєздатних клітин біфідобактерій	Методом десятикратних розведень на напіврідкому соєво-лактозному середовищі	[123,124]
2	Кількість КУО/см ³ життєздатних пропіоновокислих бактерій	Методом десятикратних розведень з наступним висівом на тверде поживне соєво-лактозне середовище	[125,126]
3	Контроль біологічної чистоти	Метод фарбування за Грамом з наступною мікроскопією зразків	125
4	Вміст вуглеводів	ГОСТ 26176-91.	[127]
5	Екстракція ліпідів	Метод Kates і Garbus	[128, 129]
6	Вміст загальних ліпідів	Визначали гравіметричним методом	[130]
7	Активна кислотність, Рн	Потенціометричний метод з використанням рН-метра, рН – 121	[131]
8	Титрована кислотність	Титрометричний метод	[131]
9	Дослідження жирно кислотного складу	Визначали за допомогою газорідної хроматографії в вигляді метилових ефірів	[132]
10	Антагоністична активність супернатанту	Визначали методом блоків за Toure	[133]
11	Визначення біфідогенних стимуляторів неуглеводної природи	Визначали за допомогою газорідної хроматографії в вигляді метилових ефірів	[134]

1	2	3	4
11	Бактеріологічний контроль. Сальмонели	Посівом на середовище Плоскірева (ГОСТ 10444-94)	[135]
12	Бактеріологічний контроль. Золотистий стафілокок.	Посівом на желточно-сольовий агар	[135]
13	Бактеріологічний контроль. Бактерії групи кишкової палички	Посівом на середовище Кеслер та Ендо (ГОСТ 30518-97)	[135]

Для визначення найбільш підходящої концентрації соєвої сироватки в лактозному живильному середовищі вивчали динаміку росту бактерій роду *Bifidobacterium* на середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%). У якості закваски використовували добову культуру біфідобактерій, яка була стандартизована до $1 \cdot 10^6$ КУО / см^3 . Контролем служило рідке поживне кукурудзяно-лактозне середовище. Динаміка росту заквасок культури була вивчена в проміжку від 0 до 48 годин при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Таблиця 2.2.

**Склад рідких поживних середовищ для культивування
біфідобактерій**

Інгредієнти	Состав среды (на 1 литр дистиллированной воды)		
	Кукурудзяно-лактозне середовище	Лактозне середовище з додавання соєвої сироватки	Бульйон MRS
1	2	3	4
Кукурудзяний екстракт	30мл/л	—	—
Соєва сироватка	—	30 мл/л	—
Пептон	10г/л	10 г/л	10 г/л
М'ясо пептонний бульйон			8,0 г/л

1	2	3	4
Дрожжевой экстракт	—	—	4,0 г/л
Лактоза	10 г/л	10 г/л	
Глюкоза	—	—	20 г/л
Аскорбінова кислота	0,5м	0,5м	—
Натрій ацетат	—	—	5,0г/л
Амоній лимоннокислий	—	—	2,0 г/л
Натрій лимоннокислий	6,0 г/л	6,0г/л	—
MgSo4	—	—	0,2 г/л
MnSo4	—	—	0,04 г/л
NaH2P4	1,0 г/л	1,0г/л	—
K2HPO4	2,0 г/л	2.0 г/л	2,0 г/л
Твін-80	—	—	1,0 г/л

Приготування соєвої сироватки. На ершому етапі при замочуванні насіння сої виникає неприємний бобовий запах, який необхідно усунути при отриманні готової сировини. Проведений аналіз показав, що основну частину ароматичних речовин складають спирти: ізобутанол, ізопентанол, гексаноол, деканол, гептанол; і летючі жирні кислоти: уксуна, мурашина, ізомасляна, ізовалерьянова. Під час обробки сої протягом 5 хвилин при температурі 120 °C в 0,5 мас.% -му розчині Na_2CO_3 при гідромодулі 1:6, виникає активація ліпоксігеназного комплексу ферментів сої. При цьому збільшувалась концентрація спиртів: ізобутанола – в 5 разів, ізопентанола – в 2,5 рази, гексанол в 2 рази. Під час бланширування відбувалась інактивація ферментів, у тому числі ліпоксігеназного комплексу та часткове видалення легколетючих продуктів розкладання. Масові частки бутанола, ізопентану і гексанолу зменшувались в 2,5 рази. Після видалення розчину Na_2CO_3 , провівши дезінтеграцію, здійснювали водну екстракцію при температурі 100 °C і гідромодулі 1:5 протягом 10 хвилин. Після фільтрації пастеризували при температурі 90 °C протягом 15 хвилин.

Перед початком сквашування, соєвий екстракт (соєве молоко) охолоджували до 37 °C. Осадження білків проводили шляхом внесення заквасочної культури при температурі 37 °C протягом 6 годин, або за

допомогою внесення 30 мас.% розчину лимонної кислоти до $pH = 4,5$ при температурі $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 15 хвилин. На останньому етапі після фільтрації соєвої сироватки нейтралізували її розчином 30 мас.% NaOH, доводячи значення активної кислотності до 6,8-7,0 од. pH.

2.3.2. Підрахунок бактерій роду *Bifidobacterium*.

У ході експерименту кількість клітин біфідобактерій, інкубованих в рідких середовищах, підраховували за допомогою лічильної камери Горяєва, і контролювали зміну активної кислотності культуральної рідини для створення графічних зображень.

Кількісний облік життєздатних клітин біфідобактерій проводили методом граничних розведень в пробірках з напіврідким латозним середовищем. Цей метод полягає у розрахунку здатності біфідобактерій до росту в напіврідких середовищах, розлитих високим стовпчиком в пробірках з подальшим термостатуванням посівів при температурі $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 72 годин.

Облік результатів здійснювали за наявністю в останньому розведенні характерних колоній у вигляді комет. За кінцевий результат аналізу приймали середнє арифметичне значення, яке отримали у двох паралельних рядах. Додатково проводили мікроскопію ізольованих колоній з встановленням морфологічних ознак.

2.3.3. Культивування пропіоновокислих бактерій.

Спосіб культивування залежить від кінцевої мети культивування: накопичування біомаси або отримання окремого продукту життєдіяльності мікроорганізму (метаболіту).

Для отримання добової культури використовували MRS (протеозопептон; м'ясний екстракт; глюкоза; дріжджовий екстракт; Твін-80;

ацетат натрію; цитрат амонію) та лактозне середовище з додаванням соєвої сироватки (лактоза; пептон; цитрат натрію; калій; натрій фосфорнокислий; аскорбінова кислота; соєва сироватка; вода).

Через свою дешевизну найчастіше використовують у виробничому масштабі середовище із сирної сиворотки, яке включає наступні компоненти: сирна сиворотка 100 мл; хлористий магній – 0,3 г; натрій лимоннокислий тризаміщений – 1 г; калій фосфорнокислий одно заміщений – 0,5 г; аскорбінова кислота - 0,1 г; агар-агар – 1,3 г. рН середовища = 6,8-7,0. Проби культивували протягом 24 год за температури (30 ± 1) °C.

2.3.4. Підрахунок бактерій роду *Propionibacterium*

Облік результатів проводили методом десятикратних розведень та розсівом на тверде поживне середовище з наступною мікроскопією препарат-мазків та прямим підрахунком пропіоновокислих бактерій у лічильних камерах Горяєва.

2.3.5. Екстракція ліпідів.

Екстракцію ліпідів з клітин проводили за методиками Kates і Garbus. Для екстракції ліпідів використовували ізопропанол: ліофілізовану біомасу суспендували в ізопропанолі з подальшим інкубуванням при 70° C протягом 30 хвилин, проводили центрифугування і переносили супернатант у пробірки. Таку процедуру повторювали два рази. Супернатанти з'єднували, випаровували азотом, після чого сухий залишок розчиняли у суміші хлороформ : метанол у відношенні 2:1. Надалі проводили очищення ліпідних екстрактів за допомогою розчину Гарбуса (рН 7,4). Хлороформний залишок випарювали, а вміст загальних ліпідів визначали гравіметрично.

2.3.6. Визначення жирно-кислотного складу пробіотичних мікроорганізмів

Кількість жирних кислот (ЖК) в сумарній фракції ліпідів визначали за допомогою газорідинної хроматографії в вигляді метилових ефірів. Аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили методом газово-рідинної хроматографії з використання газового хроматографа GC-16A "Shimadzu" (Японія) з можливістю програмування температури до 330 ° C, полум'яно-іонізаційним детектором і програмним забезпеченням "GC solution". Для поділу використовували капілярну колонку THERMO TR-FAME (30 mm x 0,25 mm ID x 0,25 μ m film) з температурним градієнтом від 70 до 230 ° C. Нерухома фаза - 70% Cyanoethyl (equiv) Polysiphenylene-siloxane. Рухома фаза - гелій, швидкість потоку газу - 1 мл/хв. Температура інжектора і детектора дорівнювала 280 ° C і 260 ° C, відповідно. Вміст ЖК виражали у відсотках від загальної суми. Ідентифікацію ЖК проводили шляхом порівняння часу утримання визначаються з'єднань з часом утримання стандартних ЖК [19].

2.3.7. Отримання метаболічної безклітинної форми пробіотика

Після сумісного культивування *B. longum* - ЯЗ +*P. shermanii* - 4 на лактозному середовищі з додаванням соєвої сироватки за температури (34 ± 1) ° C протягом 24 год був отриман супернатант культуральної рідини шляхом центрифугування при 8000 об/хв протягом 20 хв і подальшого фільтрування через бактеріальні фільтри (Sortarium, 0,22 мкм) в асептичних умовах. Аналогічним способом було отримано фільтрат культуральної рідини *P. shermanii* - 4, після культивування на лактозному середовищі з додаванням соєвої сироватки за температури (30 ± 1) ° C протягом 24 год.

2.3.8. Дослідження антагоністичної активності супернатанту, отриманого при створенні симбіозу пробіотичних мікроорганізмів.

Для дослідження утворення симбіотичним консорціумом специфічних антимікробних сполук використовували метод Touge 151. Супернатант досліджували «в момент часу» і (паралельно) після його концентрування в 10 разів.

Чашки Петрі з 25 мл МПА засівали газом відповідними тест-культурами (умовно патогенні мікроорганізми *Escherichia coli* УКМ В-906, *Staphylococcus aureus* ОНУ-223, *Bacillus cereus* ОНУ-67; патогенні *Salmonella enteritidis* ОНУ-262) у концентрації – 10^6 КУО/см³ за стандартом мутності Мак-Фарланда. Витримували 1 годину при $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$, після чого у середовищі спеціальним профламбованим свердлом, діаметром 8 мм, робили лунки і заповнювали їх супернатантом у кількості 80 мкл. Чашки витримували при $(5 \pm 1)^\circ \text{C}$ протягом 2 годин (для дифузії культуральної рідини), а потім інкубували в анаеробних умовах протягом 18 годин при $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$. Результати оцінювали шляхом вимірювання зони затримки росту.

2.3.9. Визначення 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти.

Біфідогенний стимулятор росту очищували за допомогою вакуум-фільтрації із застосуванням бактеріальних фільтрів (Sartorius, 0,22 мкм). Його визначення проводили з використанням методом газowo-рідинної хроматографії з використання газowego хроматографа GC-16A "Shimadzu" (Японія) з можливістю програмування температури до 330°C , полум'яно-іонізаційним детектором і програмним забезпеченням "GC solution", що згадували вище. Ідентифікацію DHNA проводили шляхом порівняння часу витримки речовин, що визначали з часом витримки стандартного маркера 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти.

2.3.10. Математико-статистичні методи обробки результатів досліджень.

Результати експериментальних даних обробляли загальноприйнятими методами математичної статистики [136]. Результати експериментів були оброблені за допомогою програми Table Curva 3D

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

123. ГОСТ Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах. Методические указания. МУК 4.2.999-00 (утв. Главным государственным врачом).
124. 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.
125. ГОСТ Р 55577-2013 Продукты пищевые функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности.
126. Халилова Р. Н., Абдурахманова Н. М, Велиева Г. А. Количественное определение содержания растворимых углеводов в жидком экстракте клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*) // Инновационная наука. 2015. №. 8-2. С.16-17.
127. ГОСТ 26176-91 Межгосударственный стандарт корма, комбикорма. Методы определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов.
128. Kates M. Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis, and Identification of Lipids. Newport: Newport Somerville Innovation, 2010. 422 p.
129. Garbus J., Deluca H. F., Loomans M. E. Rapid incorporation of phosphate into mitochondrial lipids // J.Biol.Chem. 1963. Vol. 238. P. 59-63.
130. ГОСТ 586790 Молоко, молочные продукты. Методы определения жира.
131. Крусъ Г.Н., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов // Москва: Колос, 200. 386с.
132. Ткаченко Ф.П., Маслов И.И. Жирные кислоты общих липидов видов рода *Cystoseira* C. Agardh (Phaeophyta) (Черное море, Крым) // Альгология. 2015. №25. С. 115-124.

133. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. / R. Toure et al // Journal of Applied Microbiology. 2003. № 95(5). P.1058-1069.

134. 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.

135. ГОСТ 9225-84 Молоко, молочные продукты. Методы микробиологического анализа.

136. Компьютерное моделирование физических и технологических процессов: теория, алгоритмы, программы / Кирилов В.Х. и соавт. // Одесса: Изд. ВМВ, 2016. 495с.

Розділ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СИНБІОТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК

Сьогодні в умовах погіршення екологічного стану навколишнього середовища, впливу радіації, нераціонального використання антибіотиків та незбалансованого харчування спостерігається зміна кількісного та якісного складу мікробіоти шлунково-кишкового тракту (ШКТ), що призводить до дисбактеріозів. Ефективними засобами відновлення мікробіоценозу ШКТ людини є пробіотики, пребіотики, синбіотики та метабіотики.

Дослідження біотехнології метабіотиків та створення на їх основі синбіотичних біологічно активних добавок є актуальним завданням та потребує наукового обґрунтування. При розробці нової біотехнології необхідно вирішити наступні питання: розробка поживного середовища для культивування симбіотичного консорціуму, науково обґрунтувати вибір пробіотичних штамів мікроорганізмів для створення симбіотика, визначення продуктів метаболізму симбіотичного консорціуму.

3.1. Розробка середовища культивування бактерій роду *Bifidobacterium*

Біфідобактерії займають особливе місце серед різних представників облигатної мікробіоти людини, яка складається на 85 – 98% з біфідобактерій. Саме біфідобіота відіграє важливу роль у підтримці та нормалізації мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту, неспецифічній резистентності організму, поліпшенні білкового обміну та інше. Дефіцит біфідобактерій є одним з патогенетичних факторів тривалих кишкових дисфункцій у дітей і дорослих, що призводить до порушення мінерального обміну і процесів кишкового всмоктування, до порушення білкового та жирового обмінів, до формування хронічних розладів травлення [137-139].

Сьогодні виробляється доволі широкий асортимент препаратів-пробіотиків, створених на основі біфідобактерій, лактококів та лактобацил, які позитивно діють на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму через оптимізацію й стабілізацію його мікроекологічного статусу [137]. В останні роки науковців приваблюють пропіоновокислі бактерії, відмінною особливістю яких є те, що вони не перетравлюються в кишково-шлунковому тракті людини, стійкі до дії жовчних кислот, витримують кислотність шлункового соку, можуть здійснювати біосинтез вітаміну B₁₂ [140].

Позитивна роль пропіоновокислих бактерій як пробіотиків також обумовлена утворенням ними пропіонової кислоти, міnorних органічних кислот, бактеріоцинів, ферментів. Окрім того, за спільного культивування екзополісахариди, синтезовані пропіоновокислими бактеріями, стимулюють ріст біфідобактерій, забезпечують їх гнучку адаптацію та захищають як окремі клітини, так і усю популяцію від несприятливих факторів зовнішнього середовища (зміна температури, низькі значення рН, заморожування і зневоднення) [141].

Все вище зазначене свідчить про те, що створення синбіотичного консорціуму на основі бактерій роду *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* є цікавим та доцільним завданням біотехнології. Саме тому у роботі використовували культури з музею кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування ОНАХТ

Вагомість пробіотичних препаратів і продуктів диктує необхідність розробки нових, ефективних, недорогих, виробничих поживних середовищ для накопичення мікробної біомаси. При виробництві біопрепаратів-пробіотиків, однією з найважливіших проблем є отримання найбільшої кількості якісної біомаси культивованих мікроорганізмів. Виробниче поживне середовище повинне забезпечувати: високу швидкість розмноження для біфідобактерій до 18 годин; високу концентрацію життєздатних клітин в одиниці об'єму - не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³; зберігання життєздатних мікробних клітин - не менше 70-90 діб. У зв'язку з цим виникла потреба

поліпшити якість виробничих поживних середовищ для мікроорганізмів шляхом додавання до них стимуляторів росту, до яких відносяться різноманітні екстракти рослинного походження

Все вищевикладене свідчить про те, що, незважаючи на наявність досягнень у галузі біотехнології пробіотиків, її вдосконалення залишається актуальним.

Відомі різні поживні середовища для культивування біфідобактерій, такі як: гідролізоване молоко, середовище Блаурокка, тіогліколеве середовище, MRS-бульйон, кукурудзяно-лактозне середовище (КЛС) (таб 3.1). Вуглеводна частина поживних середовищ представлена переважно лактозою. До їх складу також входять в якості азотистого харчування пептони і відвари рослинного і тваринного походження. У разі технологічного виробництва використовують кукурудзяно-лактозне середовище, оскільки кукурудзяний екстракт є джерелом харчових волокон і фруктоолігосахаридов, тому сам по собі стимулює ріст нормальної мікробіоти, крім того є менш коштовним, ніж сировина тваринного походження.

Таблиця 3.1.

**Склад рідких поживних середовищ для культивування
біфідобактерій.**

Інгредієнти	Склад середовища (на 1 літр дистильованої води)		
	Кукурудзяно-лактозне середовище	Лактозне середовище з додаванням соєвої сироватки	Бульон MRS
1	2	3	4
Кукурудзяний екстракт	30мл/л	—	—
Соева сироватка	—	30 мл/л	—
Пептон	10г/л	10 г/л	10 г/л
МПБ			8,0 г/л
Дріжджовий екстракт	—	—	4,0 г/л

1	2	3	4
Лактоза	10 г/л	10 г/л	
Глюкоза	—	—	20 г/л
Аскорбінова кислота	0,5г	0,5г	—
Натрій ацетат	—	—	5,0г/л
Амоній лимоннокислий	—	—	2,0 г/л
Натрій лимоннокислий	6,0 г/л	6,0г/л	—
MgSO ₄	—	—	0,2 г/л
MnSO ₄	—	—	0,04 г/л
NaH ₂ P ₄	1,0 г/л	1,0г/л	—
K ₂ HPO ₄	2,0 г/л	2.0 г/л	2,0 г/л
Твин-80	—	—	1,0 г/л

Останнім часом кукурудзяний екстракт став важкодоступним інгредієнтом для приготування поживних середовищ, тому перед нами стоїть проблема пошуку його аналога. Після вивчення хімічного складу поживних середовищ було встановлено, що найбільш повноцінним і придатним для включення в живильні середовища, призначених для культивування біфідобактерій, є зернобобові культури та продукти їх переробки. Вони містять високоякісний білок і, крім того, є джерелом поліненасичених жирних кислот, вітамінів, макро- і мікроелементів, харчових волокон, не містять холестерину і твердих жирів [139]. Нагадаємо, що біфідобактерії досить вимогливі до складу живильного середовища, а особливо наявності легкозасвоюваних азотистих сполук, амінокислот, вуглеводів, ненасичених жирних кислот, вітамінів, мінеральних елементів. Додавання деяких вітамінів до середовища дозволяє виключити з неї ряд амінокислот. Найбільш чутливі біфідобактерії до наявності тіаміну, рибофлавіну, ніацину, біотину, пантотенової кислоти. Соєве молоко є багатим джерелом водорозчинних вітамінів: тіамін, рибофлавін, ніацин, фолієвої кислоти, токоферолів, так само в ньому є вітамін К. Відомо, що мінеральний склад середовища в великій мірі впливає на зростання біфідобактерій, проте їхні потреби в мінеральних речовинах вивчені недостатньо. У синтетичних середовищах вони для зростання вимагають залізо, магній, фосфати, хлориди калію і

натрію . Соеве молоко багате фосфором, залізом, цинком, Розжарюємо. Продукти переробки сої містять такі пребіотичні олігосахариди, як стахіоза і рафіноза, які стимулюють ріст біфідобактерій, також виявляються фіторечовини сої поліфенольної природи, зокрема ізофлавіни, в кількості 1,6-2,2 мг/г сухої речовини . Ізофлавіни сої мають ряд профілактичних і лікувальних властивостей, застосовуються при різних видах ракових пухлин, атеросклерозі, остеопорозі, гормональні порушення, мають антиоксидантні властивості, тому в зарубіжних країнах використовуються при виробництві функціональних продуктів [137-140].

На першому етапі дослідження визначали зміну динаміки зростання бідобактерій на традиційних поживних середовищах (кукурудзяно-лактозне середовище, MRS - бульйон, середовище «Біфідум») і на середовищі з додаванням соєвої сироватки.

На першому етапі дослідження визначали зміну динаміки зростання біфідобактерій на традиційних поживних середовищах (кукурудзяно-лактозне середовище, MRS-бульйон») і на середовищі з додаванням соєвої сироватки. Дослідження показали, що всі три дослідні культури накопичували приблизно однакову кількість клітин на класичних середовищах: на кукурудзяно-лактозному середовищі – $1 \cdot 10^8$ КУО/см³, на бульйоні MRS – $3 \cdot 10^8$ КУО/см³, в той ж час на поживному середовищі з додавання соєвої сироватки кількість клітин складала $9 \cdot 10^9$ КУО/см³.

Середовище «Біфідум» є напіврідким готовим промисловим середовищем, яке доцільно використовувати для кількісного обліку клітин в лабораторних умовах, але не для накопичення біомаси, тому що для вирощування біфідобактерій необхідна рідке поживне середовище.

Через те, що кукурудзяно-лактозне середовище значно дешевше, ніж MRS-бульйон, то ми вибрали його у якості прототипу. При заміні кукурудзяного екстракту на соєву сироватку, експериментальне середовище дало найкращий результат, тому було вирішено використовувати його в

подальших дослідженнях для контролю культивування та накопичення біомаси.

На другому етапі дослідження вивчали зміни динаміки росту і активної кислотності біфідобактерій на рідкому лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%). Як контроль використовували кукурудзяно-лактозне середовище. Підрахунок клітин здійснювали за допомогою камери Горяєва (рис. 3.1–3.6).

Як показують отримані результати, всі зразки характеризується високою біохімічною активністю.

Після 48 годин культивування кількість клітин на середовищі з масовою часткою соєвої сироватки 3% становила: *B. bifidum* - $1-4 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. adolescentis*- C 52 – $7 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. Longum* - ЯЗ – $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³; що максимально наближалось до значень контролю, а саме: *B. Bifidum* - $1-2 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $1 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. longum* - ЯЗ– $7 \cdot 10^9$ КУО/см³; в той час як кількість клітин при культивуванні на лактозному середовищі з масовою часткою 1% і 2% були значно нижчими за контроль відповідно: *B. bifidum* - $1-1 \cdot 10^8$ КУО/см³ і $7 \cdot 10^8$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $8 \cdot 10^7$ КУО/см³ і $4 \cdot 10^8$ КУО/см³, *B. longum* - ЯЗ– $6 \cdot 10^7$ КУО/см³ і $6 \cdot 10^8$ КУО/см³. З підвищенням масової частки соєвої сироватки від 4% до 5% кількість клітин зростала відповідно: *B. bifidum* - $1-2 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ і $6 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $2 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ і $8 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, *B. longum* - 1 – $7 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ і $1 \cdot 10^{11}$ КУО/см³. Із збільшенням кількості соєвої сироватки збільшувалася також і активна кислотність середовища. У середовищі з додаванням 3% соєвої сироватки значення активної кислотності для різних культур було таким: *B. bifidum* - 1 – 4,52 одн.pH, *B. adolescentis* - C 52 – 4,6 одн.pH, *B. longum* - ЯЗ– 4,5 одн.pH. Активна кислотність у середовищі із додаванням 4% та 5% соєвої сироватки мала такі показники відповідно: *B. bifidum* - 1– 4,42 і 4,31 одн.pH, *B. adolescentis* - C 52 – 4,4 і 4,43 одн.pH, *B. longum* - ЯЗ– 4,45 і 4,4 одн.pH.

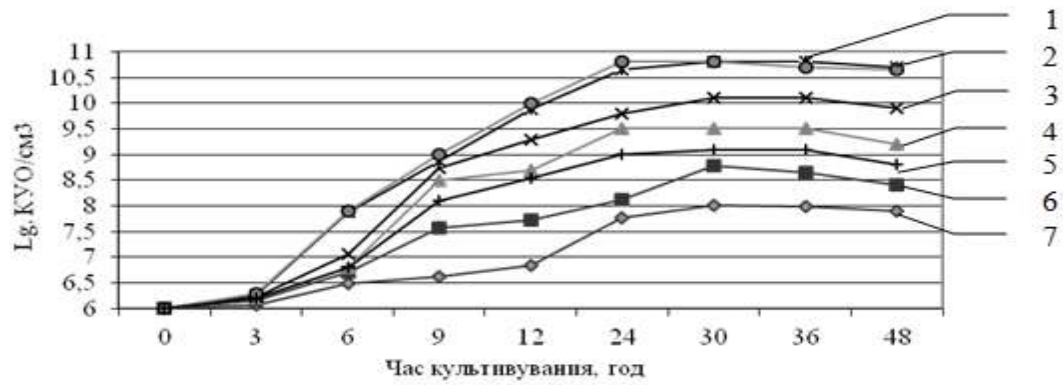


Рис. 3.1. - Динаміка росту *B. bifidum-1* на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки у кількості: 1 – 6%; 2 – 5%; 3 – 4%; 4 – 3%; 5 – контроль; 6 – 2%; 7 – 1%.

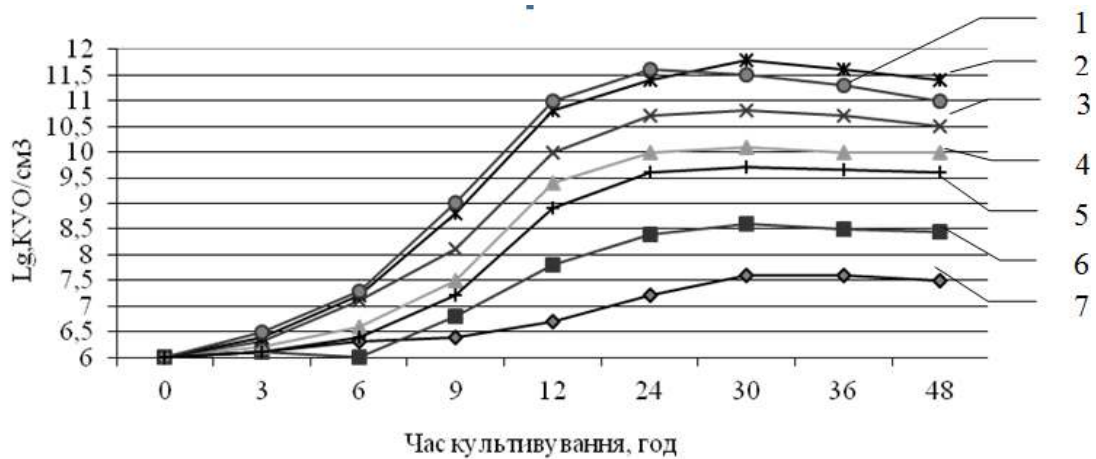


Рис. 3.2. - Динаміка росту *B. adolescentis* на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки у кількості: 1 – 6%; 2 – 5%; 3 – 4%; 4 – 3%; 5 – контроль; 6 – 2%; 7 – 1%.

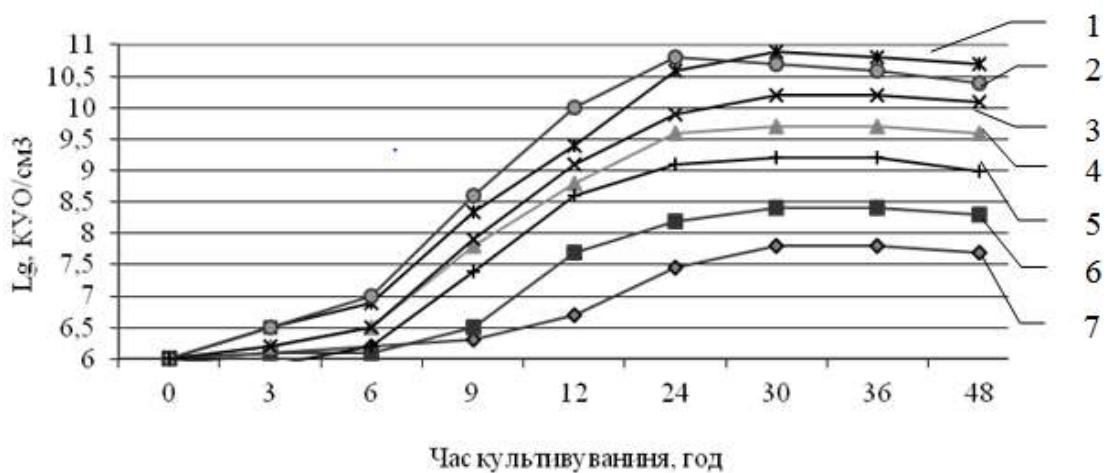


Рис. 3.3 - Динаміка росту *B. longum-ЯЗ* на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки у кількості: 1 – 6%; 2 – 5%; 3 – 4%; 4 – 3%; 5 – контроль; 6 – 2%; 7 – 1%.

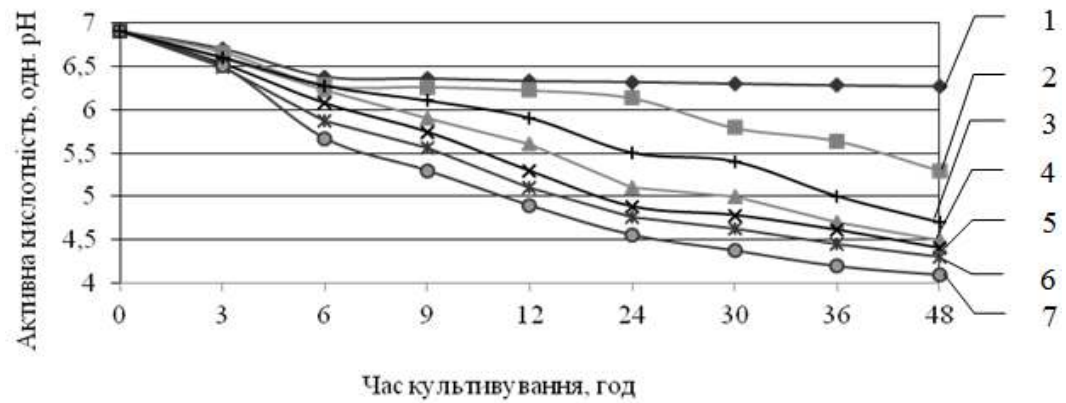


Рис. 3.4. - Зміна активної кислотності при культивуванні *B. bifidum-1* на середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки : 1 – 1 %; 2 – 2 %; 3 – контроль; 4 – 3%; 5 – 4 %; 6 – 5 %; 7– 6 %.

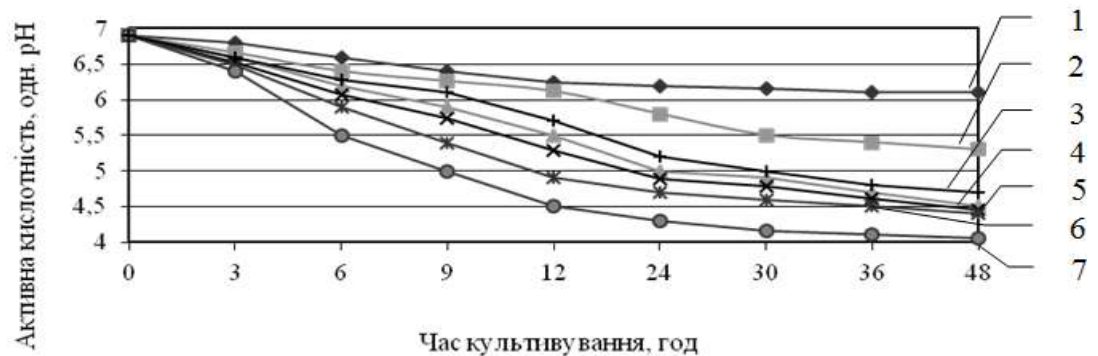


Рис. 3.5. - Зміна активної кислотності при культивуванні *B. longum-ЯЗ* на середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки : 1 – 1 %; 2 – 2 %; 3 – контроль; 4 – 3%; 5 – 4 %; 6 – 5 %; 7 – 6 %.

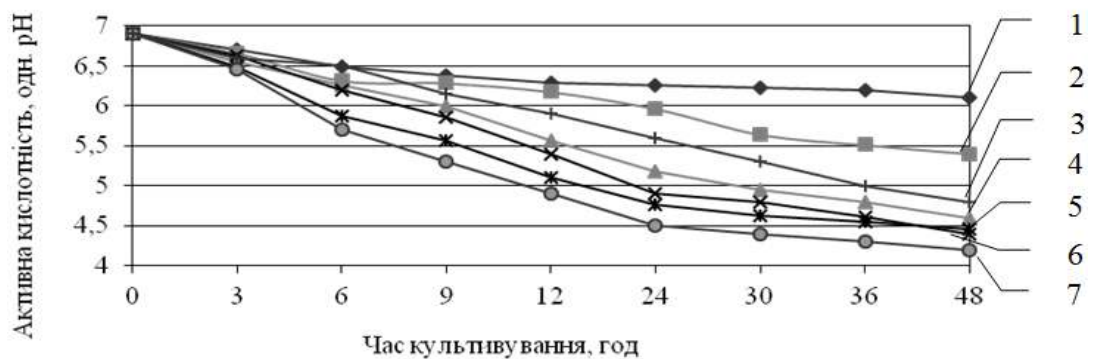


Рис. 3.6. - Зміна активної кислотності при культивуванні *B. adolescentis* на середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки - С 52 : 1 – 1 %; 2 – 2 %; 3 – контроль; 4 – 3%; 5 – 4 %; 6 – 5 %; 7 – 6 %.

Подальше збільшення масової частки сироватки до 6% незначно позначається на показниках приросту біомаси, в порівнянні із зразком, який містить 5% соєвої сироватки. Так кількість клітин станом на 24 годину культивування була такою: *B. bifidum*-1 – $4 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $8 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, *B. longum* - ЯЗ – $6 \cdot 10^{11}$ КУО/см³, але вже на 30 годину кількість клітин була нижчою, ніж на середовищі з додаванням 5% соєвої сироватки, та продовжувала знижуватися далі. На середовищі з додаванням 6% соєвої сироватки відбувався активний приріст біомаси бактерій, ростові фактори середовища виснажувалися, накопичувались продукти метаболізму, про що свідчать значення активної кислотності, які мали значно нижчі показники, ніж в інших експериментальних зразках: *B. bifidum*-1 – 4,1 одн. рН, *B. adolescentis* - C 52 – 4,05 одн.рН, *B. longum* - ЯЗ – 4,2 одн.рН. Все вище зазначене спричинило внутрішньовидову конкуренцію за споживання поживних речовин, що стало причиною зниження кількості клітин та значного збільшення кислотності після 24 годин культивування. Через те, що показник приросту біомаси бактерій на середовищі з додавання 3% масової частки соєвої сироватки має необхідне значення для використання в харчовій промисловості і максимально наближався до контролю, то ми пропонуємо цю концентрацію для використання у виробництві продуктів харчування з пробіотичними властивостями, в той час, як показники приросту біомаси на середовищі з додаванням 4% і 5% соєвої сироватки відповідають вимогам для виробництва біологічно активних добавок, то це дозволяє рекомендувати середовище з додаванням цих масових часток соєвої сироватки для культивування біфідобактерій з метою отримання біологічно-активних препаратів, призначених для корекції мікробіоти кишечника, профілактики та лікування дизбактеріозів. Виявлено, що при культивуванні біфідобактерій на запропонованому живильному середовищі морфологічні, культуральні властивості біфідобактерій всіх штамів відповідають вимогам ВООЗ.

В мазках з культур, що вирости на експериментальному живильному середовищі всі штами біфідобактерій, мали типову морфологію палички з біфуркацією чи потовщенням з одного кінця, розташовувалися у вигляді пучків, а також у вигляді окремих особин [137, 140].

Оскільки штам *B. longum* - ЯЗ був найбільш чутливим до зміни кількості ростового фактора рослинного походження, то було доцільно дослідити вплив різних доз соєвої сироватки на питому швидкість росту, тривалість генерації та продуктивність біотехнологічного процесу.

За отриманими показниками КУО визначали питому швидкість росту та тривалість генерації. Питому швидкість росту мікроорганізмів визначали за виразом:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (1),$$

де μ – питома швидкість росту; x – кількість колонієутворюючих одиниць; $\frac{dx}{dt}$ – залежність кількості колонієутворюючих одиниць в залежності від часу культивування.

Тривалість генерації визначали за виразом:

$$tp = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2),$$

де tp – тривалість генерації; μ – питома швидкість росту. У якості стимулятора росу біфідобактерій використовували соєву сироватку у кількості від 1% до 6% від загального об'єму середовища культивування.

За даними тривалості генерації визначали час, який пройшов між двома поділами бактеріальних клітин. Показники ПШР та ТГ визначали в проміжках часу між 0-3, 0-6, 0-9, 0-12, 0-24, 0-30, 0-36, 0-48 годинами культивування дослідних штамів біфідобактерій.

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.

Таблиця 3.2

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⁻¹						
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, год¹						
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

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

Завдання біотехнології – це скорочення непродуктивної фази лаг-фази та подовження експоненціальної фази. Скорочення лаг-фази сприяє ідентичності поживного середовища інокуляту и промислового процесу, а головне – збільшення об'єму інокуляту за менш тривалий час культивування. Подовження експоненціальної фази є складною задачею

біотехнології, яка полягає у том, щоб не допустити вичерпання поживних речовин та у тому, щоб своєчасно видаляти продукти метаболізму, які інгібують ріст мікроорганізмів.

Продуктивність біотехнологічного процесу визначається кількістю цільового продукту, який отримують з одиниці об'єму культуральної рідини за одиницю часу (рис 3.7):

$$P_{cp} = \frac{x_k - x_0}{t} \quad (3),$$

де x_k – вихід біомаси, x_0 – початкова бактеріальних кількість, t – час культивування.

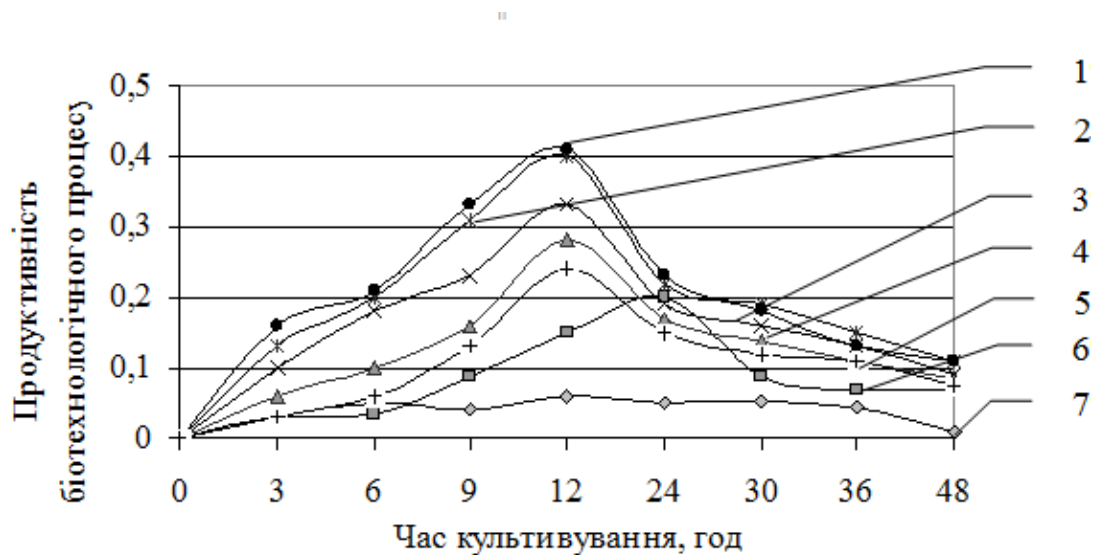


Рис. 3.7. – Продуктивність біотехнологічного процесу за різної масової частки соєвої сироватки у поживному середовищі: 1 – 6%; 2 – 5 %; 3 – 4 %; 4 – 3%; 5 – контроль; 6 – 2%; 7 – 1 %.

За результатами експериментальних даних було визначено, що зі збільшенням кількості соєвої сироватки кількість цільового продукту збільшувалась. При додавання 1% та 2% соєвої сироватки експоненціальна фаза росту була більш тривалою, але характеризувалась найменшою продуктивністю процесу культивування и була значно меншою, ніж у контролі. Проте вже з додаванням у середовище культивування від 3% масової частки соєвої сироватки продуктивність біотехнологічного процесу значно збільшувалась. При цьому найбільша кількість накопичення

пробіотичної біомаси *B. longum* - ЯЗ відбувалась у проміжку від 6 год до 12 год, що свідчить про логарифмічну фазу культивування біфідобактерій. Як вже зазначено у попередніх результатах експериментальних даних (рис. 3.2, 3.5) цей період характеризувався не тільки стрімким збільшенням кількості бактеріальних клітин *B. longum* - ЯЗ, а також зниженням показників активної кислотності. З плином наступного часу відмічено стрімке зниження продуктивності, проте ще відбувалось поступове накопичення біомаси та зниження значень активної кислотності, що свідчить про поступове виснаження поживного середовища і накопичення значної кількості продуктів метаболізму, а саме молочної кислоти. Станом на 24 год культивування кількість клітин *B. longum* - ЯЗ була у межах $\cdot 10^{10}$ КУО/см³, а показники активної кислотності – 4,2 одн.рН. Вже на 48 год культивування спостерігали значне зниження продуктивності культивування біфідобактерій, що також підтверджено зниженням кількості бактеріальної маси та зниженням значення рН.

Культивування на середовищі з додаванням 3% соєвої сироватки за показниками продуктивності біотехнологічного процесу були найбільш близькими до значень контролю, хоча дещо перевищував його. Хоча зі збільшенням 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.

Відомий метод визначення кількості біфідобактерій ґрунтується на приготуванні послідовних десятикратних розведень зразків, які досліджуються, та на приготуванні напіврідкого поживного середовища для визначення кількості життєздатних бактерій роду *Bifidobacterium*. Для того, щоб підрахувати характерні колонії у складі експериментального лактозного середовища з різною кількістю соєвої сироватки збільшували кількість агар-агару від 2,5 г до 17 г на 1 літр поживного середовища з наступним культивуванням.

Після 72 годин культивування у напіврідкому поживному середовищі з додаванням 3% соєвої сироватки дослідні культури біфідобактерій утворювали наступну кількість колонієутворюючих одиниць: *B. bifidum*-1 – $5 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $6 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. longum*-ЯЗ – $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, що максимально наближувалися до значень у контрольному зразку: *B. bifidum*-1 – $4 \cdot 10^9$ КУОЕ/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $5 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. longum*-ЯЗ – $9 \cdot 10^9$ КУО/см³. З підвищенням масової частки соєвої сироватки від 4% до 5% кількість життєздатних клітин збільшувалася відповідно: *B. bifidum*-1 – $6 \cdot 10^9$ КУО/см³ і $7 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $7 \cdot 10^9$ КУО/см³ і $8 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. longum*-ЯЗ – $3 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ і $4 \cdot 10^{11}$ КУО/см³. Колонієутворюючі одиниці мали вигляд комет або зерен з утворенням верхньої стерильної зони, що характерно для бактерій роду *Bifidobacterium* (табл.3.3.).

В останньому зразку експериментального середовища (6% соєвої сироватки) вже за першу добу культивування показники кількості колонієутворюючих одиниць усіх штамів роду *Bifidobacterium* перевищували показники інших зразків запропонованих середовищ: *B. bifidum*-1 – $5 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $9 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. longum*-ЯЗ – $5 \cdot 10^{10}$ КУО/см³.

При подальшому культивуванні кількість клітин біфідобактерій збільшувалася, але не значно відрізнялася від показників в зразках середовища з додаванням 5% соєвої сироватки, а вже на третю добу культивування – була нижчою. Крім того на другу і третю добу культивування показники залишалися незмінними, отже це можна пояснити, що бактерії вичерпали поживні речовини середовища протягом першої доби культивування, і надалі не були здатні активно розвиватися і накопичувати біомасу, тобто знаходилися в стаціонарній фазі та переходили до фази відмирання.

Колонії мали вигляд довгих тяжів або комет. При анаеробних умовах (заливали маслом поверхню напіврідкого середовища) ріст був рівномірним

Таблиця 3.3.

Вплив масової частки соєвої сироватки на ріст і розвиток бактерій роду *Bifidobacterium* у напіврідкому лактозному середовищі.

(n=3, P≥0,95)

Назва штаму	Масова частка соєвої сироватки, %	Час культивування, год		
		24год	48год	72год
<i>B. bifidum-1</i>		Показники росту мікроорганізмів, КУО/см ³		
	1%	$3 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^7$
	2%	$5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
	3%	$6 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^9$
	4%	$4 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^9$
	5%	$1 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^9$
	6%	$6 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$
	Контроль (КСЛ)	$2 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^9$
<i>B. adolescentis - C 52</i>		Показники росту мікроорганізмів, КУО/см ³		
	1%	$4 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^7$
	2%	$7 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^8$
	3%	$6 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^9$
	4%	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^9$
	5%	$3 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^9$
	6%	$5 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^9$
	Контроль (КСЛ)	$4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^9$
<i>B. longum-ЯЗ</i>		Показники росту мікроорганізмів, КУО/см ³		
	1%	$5 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^7$
	2%	$9 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^8$
	3%	$8 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^{10}$
	4%	$6 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^{10}$
	5%	$8 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^{10}$
	6%	$6 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$
	Контроль(КСЛ)	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^9$

по всьому об'єму пробірки, у випадку відсутності маслянистої плівки, яка утворювала б анаеробні умови, колонії біфідобактерій знаходились ближче до дна пробірки.

В мазках культивованих мікроорганізмів, що вирости на запропонованих зразках напіврідких середовищ, усі препарати при мікроскопії мали типову для біфідобактерій морфологію паличок і розташовувалися у вигляді пучків, а також у вигляді окремих особин, при фарбуванні за методом Грама – фарбувалися як грампозитивні. Сторонні мікроорганізми не виявлялися.

На наступному етапі досліджень соєво-лактозного середовища проводили визначення концентрації біфідобактерій в пробіотичному препараті використовували «Біфідумбактерин» у формі ліофілізату з різним строком придатності (таб. 3.4). Дослідження проводили у вересні місяці 2015 року. Отримано результати кількості життєздатних клітин біфідобактерій, які виражали у колонієутворюючих одиницях в 1см^3 (КУО/см³) та титрованої кислотності – у градусах Тернера (°Т) на соєво-лактозному й кукурудзяно-лактозному поживних середовищах.

Таблиця 3.4.

Визначення показників росту біфідобактерій та титрованої кислотності «Біфідумбактерину» на різних поживних середовищах.

(n=3, P≥0,95)

Назва препарату, строк придатності	СЛС			КЛС	
	Кількість соєвої сироватки в	Кількість клітин біфідобактерій, КУО/см ³	Титрована кислотність, °Т	Кількість клітин біфідобактерій, КУО/см ³	Титрована кислотність, °Т
«Біфідумбактерин» Придатний до 01.16	3	$4 \cdot 10^9$	60	$3 \cdot 10^9$	58
	4	$5 \cdot 10^9$	62		
	5	$6 \cdot 10^9$	63		
«Біфідумбактерин» Придатний до 10.15	3	$2 \cdot 10^9$	55	$2 \cdot 10^9$	53
	4	$3 \cdot 10^9$	56		
	5	$4 \cdot 10^9$	56		

При визначенні концентрації біфідобактерій в пробіотичному препараті «Біфідумбактерин» у формі ліофілізату з різним строком

придатності було виявлено, що всі експериментальні зразки напіврідкого поживного соєво-лактозного середовища незначною мірою відрізнялися від контролю, проте мали більш високі показники колонієутворюючих одиниць та титрованої кислотності.

Титрована кислотність має важливе значення для пробіотичного ефекту та вказує на здатність до метаболізму культивованих організмів. Титрована кислотність середовища у всіх зразках з додаванням соєвої сироватки була вищою, ніж у контрольному зразку з КСЛ, про що свідчить якість середовища. Проте прослідковувалось зниження кислотності та зменшення кількості клітин у препараті, у якому строк зберігання до жовтня 2015 року, що можна пов'язати із зниженням якості препарату через те, що він добігав до завершення дати придатності [138].

3.2. Культивування бактерій роду *Propionibacterium*

У роботі, окрім біфідобактерій, проводили експериментальну роботу з використанням бактерій роду *Propionibacterium*, а саме штам *Propionibacterium shermanii* – 4.

В залежності від промислових цілей для культивування пропіоновокислих бактерій використовують різні поживні середовища. Відомим середовищем культивування 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.

Його використання є технологічно та економічно вигідним, оскільки сирна сироватка представляє побічний продукт при переробці молочної сировини. Після вивчення хімічного складу поживних середовищ, літературних джерел та з урахуванням сумісного культивування пропіоновокислих бактерій з біфідобактеріями, досліджували ріст та розвиток ПКБ при культивуванні на наступних середовищах: MRS-

середовищі; соєволактозному середовищі, яке було розроблене нами; середовищі із сирної сироватки.

Сирна сироватка багата на кількість лактози, яка є спільним компонентом соєволактозного середовища для культивування біфідобактерій. Окрім цього біохімічні показники динаміки росту пропіоновокислих бактерій на соєволактозному середовищі (СЛС), які виражали в колоніє утворюючих одиницях (рис 3.8.), були вищими за показники при культивуванні на інших середовищах, а стаціонарна фаза була більш тривалою.

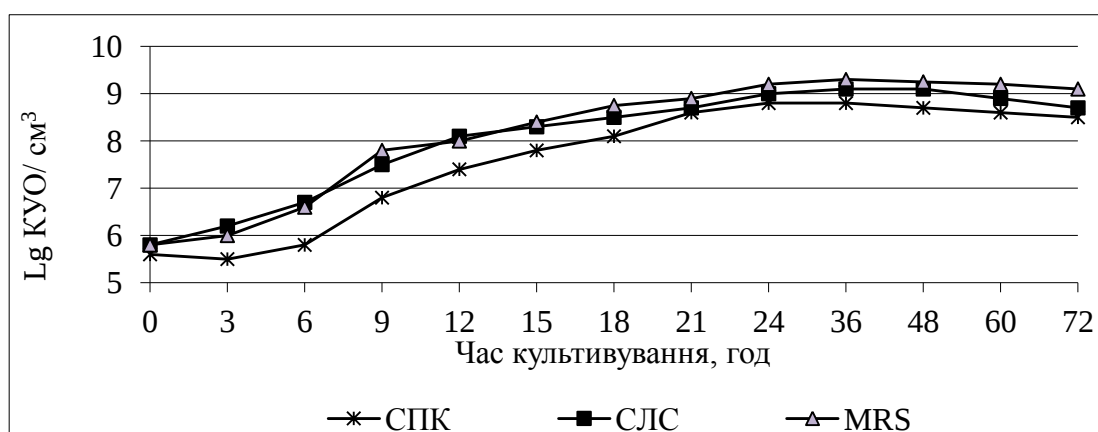


Рис. 3.8. – Динаміка росту *P. shermanii* - 4 на різних поживних середовищах

З урахуванням цих експериментальних даних, економічної та технологічної вигідності, було запропоновано замінити 10 г/л сухої лактози на сирну сироватку у кількості 200 мл/л. За допомогою рефрактометра було визначено, що у 100мл сирної сироватки містилось сухих речовин у кількості 5 г. Тому для збереження пропорції вмісту всіх компонентів соєволактозного середовища використовували: 30 мл/л соєвої сироватки; 200 мл/л сирної сироватки, що дорівнювало 10 г/л сухої лактози; 10 г/л пептону; 0,5 г/л аскорбінової кислоти; 6 г/л лимоннокислого натрію тризаміщеного; 2 г/л фосфорнокислого калію одно заміщеного, сірчанокислого магнію – 1 г/л, 2,5 г/л агар-агару, води дистильованої до об'єму 1 л.

У якості параметрів які характеризували динаміку накопичення біомаси проіоновокислих бактерій на соєволактозному середовищі, середовищі із сирної сироватки та на соєволактозному середовищі, в якому замінили суху лактозу на 200мл/л сирної сироватки, використовували показники оптичної густини (ОГ) (таб. 3.5).

Оптична густина – це фізична величина, за домпомогою якої по мірі прозорості культурального середовища характеризували постійно наростаючу кількість біомаси проіоновокислих бактерій .

Таблиця 3.5.

Показники оптичної густини проіоновокислих бактерій на різних середовищах.

(n=3, P≥0,95)

Час культивування, год	Поживні середовища		
	соєволактозне середовище	середовище із сирної сироватки	соєволактозне середовище+ сирна сироватка
	Показники оптичної густини, ОГ * ООПн		
0	0,03	0,03	0,03
3	0,14	0,13	0,15
4	0,15	0,15	0,28
6	0,16	0,18	0,32
11	0,25	0,21	0,48
21	0,92	1,2	0,95
24	1,21	1,48	1,23

В перші 6 годин культивування мікроорганізмів на соєволактозному та сирному середовищах показники оптичної густини суттєво не відрізнялися. В цей час відмічено лаг-фаза - адаптація мікроорганізмів до середовищ та умов культивування. В наступні 6 годин спостерігалася лог-фаза – стрімке зростання біомаси проіоновокислих бактерій, при чому показники ОГ на середовищі із сирної сироватки були дещо вищими за показники ОГ на соєволактозному середовищі. В той час лаг-фаза проіоновокислих бактерій при культивуванні на соєволактозному середовищі, в якому замінили суху лактозу на 200мл/л сирної сироватки, була коротшою, що свідчить про кращу

адаптацію мікроорганізмів до компонентів середовища і вже починаючи з 4 години культивування відмічено експоненціальну фазу, що характеризувалась високою активністю розмноження мікроорганізмів, що досліджували, в геометричній прогресії. Результати експериментальних даних свідчили про доцільність використання сирної сыворотки у якості джерела лактози.

3.3. Підбір режимів сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій

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. Нагромадження біомаси зазначеними культурами, яке спостерігали за оптимальних температур, слугувало контролем [143].

Аналіз результатів сумісного культивування за температури 37°C показав зниження нагромадження біомаси *P. shermanii* - 4 до $6 \cdot 10^8$ КУО/см³ в порівнянні з контрольним зразком, який вирощували за оптимальної температури – 30°C , а кількість клітин біфідобактерій була на порядок вищою: *B. bifidum* - 1 – $5 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. adolescentis* - С 52 – $3 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. longum* - Я 3 – $6 \cdot 10^9$ КУО/см³, так як для них такий температурний режим є оптимальним (рис. 3.9).

Термостатування за температури $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 24 годин гальмувало ріст біфідобактерій. Нагромадження біомаси дослідженими бактеріями знизилося: *B. bifidum* - 1– до $4 \cdot 10^8$ КУО/см³, *B. adolescentis* - С 52 – до $9 \cdot 10^7$ КУО/см³, *B. longum* - Я 3 – до $6 \cdot 10^8$ КУО/см³, порівнюючи з контрольним зразком. В той час, як показник кількості клітин *P. shermanii* - 4

був найвищим – $4 \cdot 10^9$ КУО/см³ (цей температурний режим є оптимальним для вирощування пропіоновокислих бактерій) (рис. 3.10.).

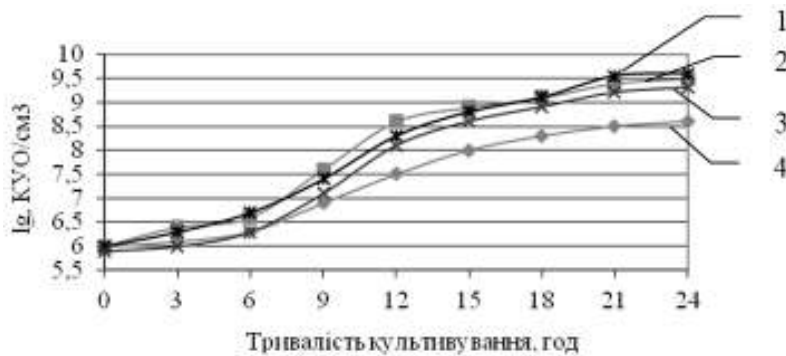


Рис. 3.9. Динаміка росту пробіотичних культур за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (контрольний зразок для біфідобактерій): 1 – *B. longum*- Я 3, 2 – *B. bifidum*-1, 3 – *B. adolescentis*- С 52, 4 – *P. shermanii* - 4

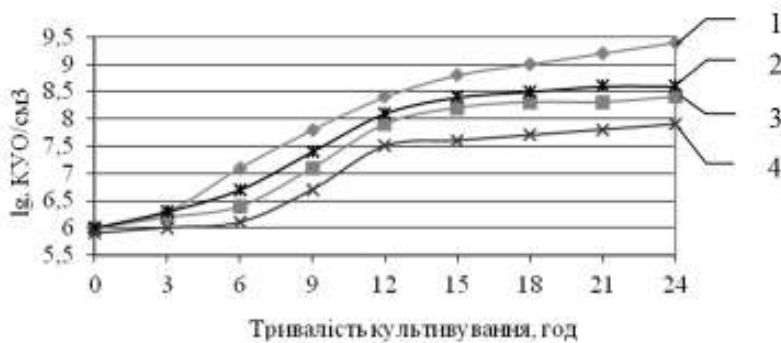


Рис. 3.10. Динаміка росту пробіотичних культур за температури $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (контрольний зразок для пропіоновокислих бактерій): 1 – *P. shermanii* - 4, 2 – *B. longum*- Я 3, 3 – *B. bifidum* -1, 4 – *B. adolescentis*- С 52

Зміна оптимальних температур культивування бактерій призводить до зниження біомаси, тоді як за проміжної температури $(34 \pm 1) ^\circ\text{C}$ спостерігається рівномірний ріст пробіотичних мікроорганізмів, показники біомаси пропіоновокислих та біфідобактерій за даної температури наближаються один до одного: *P. shermanii* - $4 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. bifidum* - $3 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. adolescentis* С 52 – $2 \cdot 10^9$ КУО/см³, *B. longum* – Я 3 – $4 \cdot 10^9$ КУО/см³ (рис. 3.11).

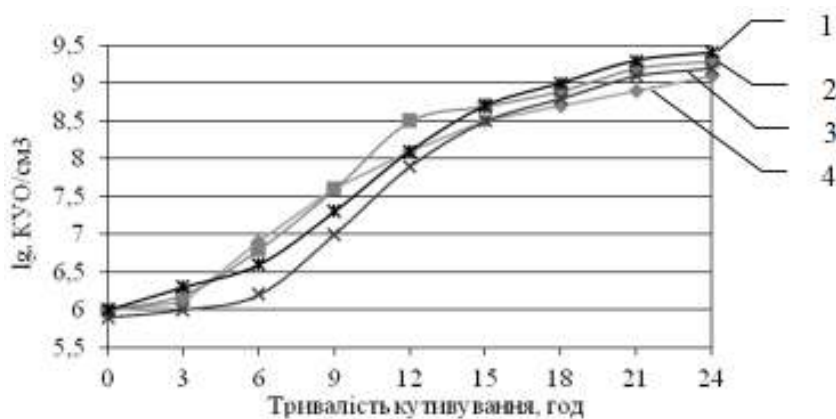


Рис. 3.11. Динаміка росту пробіотичних культур за температури $(34\pm 1)^\circ\text{C}$: 1 – *B. longum* –Я 3, 2 – *B. bifidum*-1, 3 – *B. adolescentis* - C 52, 4 – *P. shermanii* - 4.

За результатами цих досліджень для сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій був обраний такий оптимальний режим: температура $(34\pm 1)^\circ\text{C}$, тривалість культивування – 24 години.

Подальше сумісне культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій проводили з метою визначення оптимального варіанту внесення бактерій. Найбільш інтенсивний ріст біфідобактерій спостерігали у першій серії експерименту за одночасного внесення культур: *B. bifidum* – 1 – $2 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, *B. adolescentis* - C 52 – $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, *B. longum* – Я 3 – $3 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ (рис. 3.12-3.14). Це можна пов'язати з тим, що логарифмічні фази росту обох мікроорганізмів при окремому культивуванні співпадають, тим самим при подальшому сумісному культивуванні продукти життєдіяльності, накопичені пропіоновокислими бактеріями, стимулюють ріст біфідобактерій. 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. Це можна пояснити тим, що внесені пропіоновокислі бактерії почали використовувати поживні речовини середовища та деякі продукти метаболізму біфідобактерій для свого росту, проте вже на 24 годину культивування біомаса комбінованої закваски в першій та другій лінії була однаковою – $4\text{--}5 \cdot 10^{10}$ КУО/см³.

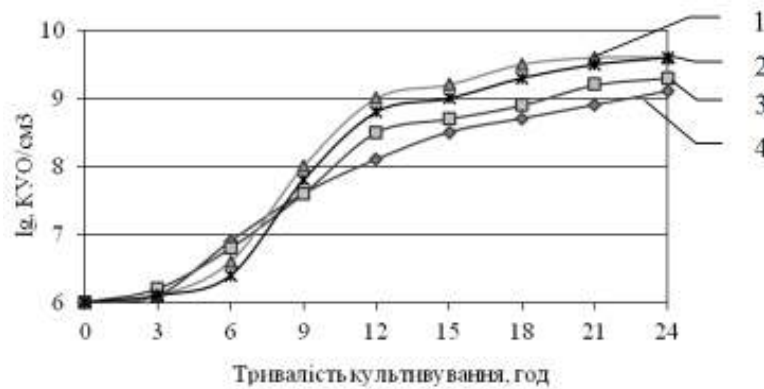


Рис. 3.12. Вплив *P.shermanii*- 4 на динаміку росту *B.bifidum*– 1 при сумісному культивуванні (1:1) 1 – *B. bifidum* - 1 + *P. shermanii*- 4, 2 – *B. bifidum* - 1 + *P. shermanii* - 4 (через 5 год), 3 – *B. bifidum* - 1, 4 – *P. shermanii* - 4

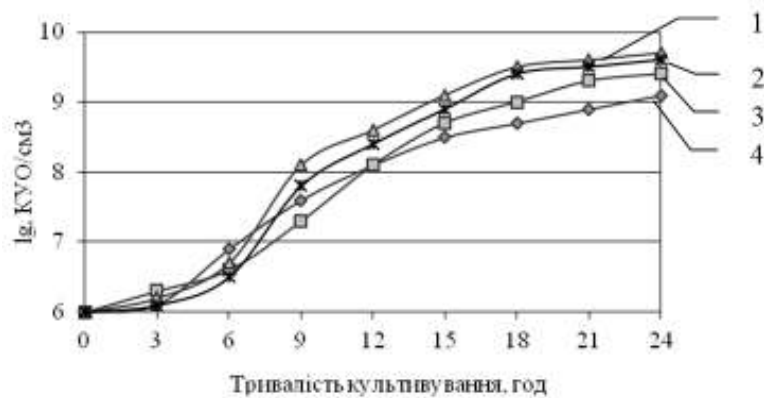


Рис. 3.13. Вплив *P.shermanii* - 4 на динаміку росту *B. longum*– Я 3 при сумісному культивуванні (1:1): 1 – *B.longum*– Я 3 + *P. shermanii*- 4, 2 – *B. longum*– Я 3 + *P. shermanii* - 4 (через 5 год), 3 – *B. longum*– Я 3, 4 – *P. shermanii*- 4

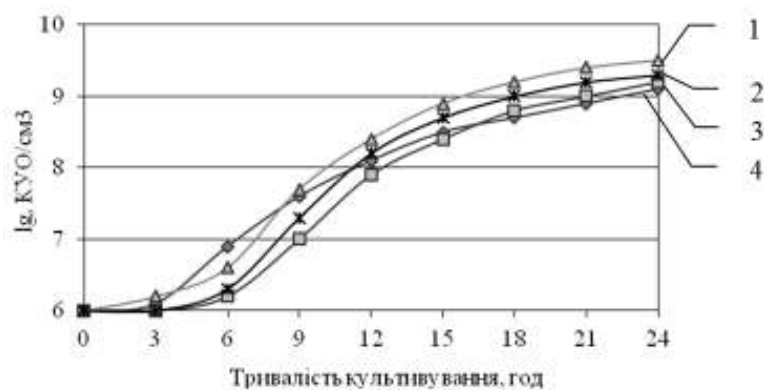


Рис.3.14. Вплив *P.shermanii* - 4 на динаміку росту *B adolescentis* - C 52 при сумісному культивуванні (1:1)): 1 – *B. adolescentis* - C 52 + *P. shermanii* - 4, 2 – *B. adolescentis* - C 52 + *P. shermanii* - 4 (через 5 год), 3 – *B. adolescentis* - C 52 , 4 *P. shermanii* - 4

За результатами досліджень визначено, що одночасне внесення бактеріальних інокулятів у співвідношенні 1:1 за проміжної температури

(34±1) °C було найбільш вдалим для росту та накопичення біомаси пробіотичними культурами [143-144].

Результати подальших експериментів показали, що культури пробіотичних бактерій, культивованих в асоціації за одночасного внесення інокулятів у співвідношенні 1:1, мають вищу біохімічну активність, ніж в монокультурі, про що свідчить збільшення біомаси клітин біфідо- і пропіоновокислих бактерій та підвищення кислотного потенціалу комбінованої закваски (таб 3.6.).

Щільність популяції пробіотичних мікроорганізмів в консорціумі збільшувалась з 10^9 КУО/см³ до 10^{10} КУО/см³, що говорить про симбіотичні зв'язки біфідо- та пропіоновокислих бактерій.

Таблиця 3.6.

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

(n=3, P ≤ 0,95)

Показники	У монокультурі				У консорціумі бактерій у співвідношенні 1:1		
	B. longum - Я 3	B. bifidum - 1	B. adolescentis - C 52	P. shermanii - 4	B. longum - Я 3 + P. shermanii - 4	B. bifidum - 1 + P. shermanii - 4	B. adolescentis - C 52 + P. shermanii - 4
Кількість клітин біфідобактерій, КУО/см ³	4·10 ⁹	3·10 ⁹	2·10 ⁹	—	3·10 ¹⁰	2·10 ¹⁰	1·10 ¹⁰
Кількість клітин пропіоновокислих бактерій, КУО/см ³	—	—	—	1·10 ⁹	4·10 ¹⁰	2·10 ¹⁰	2·10 ¹⁰
Активна кислотність, рН	4,7	4,7	4,9	5,9	5,3	5,3	5,4
Титрована кислотність, °T	64	62	59	70	74	73	71

Пропіоновокислі бактерії відомі своєю здатністю до утворення вітаміну В₁₂, який є важливим джерелом у якості одного з компонентом субстрату для розвитку клітин біфідобактерій. В свою чергу, біфідобактерії метаболізують лактозу до лактату, що спрощує метаболітичний шлях пропіоновокислих

бактерій, тим самим прискорюючи розвиток та накопичення пропіоновокислих бактерій. Окрім того, біфідо- та пропіоновокислі бактерії є постійними мешканцями шлунково-кишкового тракту. Всі ці характеристики дають підстави для висновку, що біфідо- та пропіоновокислі бактерії мають симбіотичні зв'язки (мутуалізм) і вдале поєднання вищезазначених мікроорганізмів має великі перспективи для створення симбіотичної закваски пробіотичної дії.

Одержані результати експерименту [143] 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.

За сумісного культивування з пропіоновокислими бактеріями *B. longum* - ЯЗ характеризувався найвищою біохімічною активністю. У комбінованій заквасці *B. longum* - ЯЗ було $3 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, а активна кислотність досягала 5,3 одн.рН, титрована кислотність – 74°T .

3.4. Визначення жирнокислотного складу пробіотичних консорціумів з включенням пропіоновокислих бактерій

З розвитком промислового ринку біологічно активних добавок (БАД) з вмістом поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), з'явилася потреба в пошуку нових джерел. Перспективним джерелом ліпідів, а саме ПНЖК, є мікроорганізми. Вони мають ряд переваг в порівнянні з сировиною рослинного і тваринного походження. Мікроорганізми здатні швидко накопичувати біомасу на простих середовищах. При цьому вони синтезують і накопичують в клітинах до 50% ПНЖК [144, 145].

Відомо, що надходження насичених жирних кислот і поліненасичених жирних кислот в рівній мірі необхідно для організму людини, вони також

беруть участь в одних і тих же біохімічних реакціях. Важливо відзначити, що існує зворотний зв'язок між концентрацією холестерину в крові людини і змістом в його раціоні харчування ПНЖК. Таким чином, запобігання атеросклеротичних уражень судин можливо за рахунок системного застосування продуктів пробіотичного призначення [144, 146].

У всіх живих організмів біосинтез ПНЖК протікає в два етапи. Для цього необхідна присутність двох ферментів - елонгази і десатурази [144, 147].

Мікроорганізми і деякі безхребетні мають безліч ферментів, що володіють десатуразною і елонгазною активністю, які необхідні для *de novo* синтезу різних ПНЖК, і є первинними продуцентами цих речовин [144, 148-150]. У них олеїнова кислота за допомогою десатурази $\Delta 12$ перетворюється в лінолеву, яка є головним попередником біосинтезу ПНЖК. І далі, мікроорганізми перетворюють лінолеву кислоту в більш довголанцюгові жирні кислоти серією реакцій десатурації і елонгацій [144, 151].

Бактерії роду *Propionibacterium* є представниками облигатної мікробіоти рубця жуйних тварин. Ці бактерії конвертують лінолеву кислоту в різні ізоформи кон'югованої лінолевої кислоти (КЛК). Утворення ізоформ КЛК здійснюється за допомогою біогідрогенації. Завдяки цьому процесу, молоко і м'ясо жуйних тварин є основними харчовими джерелами ненасичених жирних кислот.

Такі мікроорганізми, як *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* так само мають ізомерази лінолевої кислоти, яка дозволяє їм утворювати ненасичені жирні кислоти в якості механізму детоксикації [144, 152, 153]. Тому розробка БАД і заквасок з використанням таких мікроорганізмів є важливим біотехнологічним завданням.

Результати досліджень показали, що пропіоновокислі бактерії в асоціації з біфідобактеріями мають більш високу біохімічну активність, ніж в монокультурі [143]. Про це свідчить як збільшення біомаси клітин біфідо- і

пропіоновокислих бактерій, так і підвищення кислотного потенціалу комбінованої закваски (табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

Показники розвитку досліджуваних бактерій в монокультурі та в консорціумі

(n = 3, P ≤ 0,95)

Показники	У монокультурі	У консорціумі бактерій в співвідношенні 1:1	
	P. shermanii - 4	B. longum - ЯЗ+ P. shermanii - 4	B. adolescentis - C52+ P. shermanii - 4
Кількість клітин біфідобактерій, КУО/см ³	—	3·10 ¹⁰	2·10 ¹⁰
Кількість клітин пропіоновокислих бактерій, КУО/см ³	2·10 ⁹	4·10 ¹⁰	2·10 ¹⁰
Активна кислотність, рН	5,9	5,4	5,3
Титрована кислотність, °Т	70	74	73

Щільність популяції пробіотичних мікроорганізмів в консорціумі збільшувалася з 10⁹ КУО/см³ до 10¹⁰ КУО/см³, що говорить про симбіотичних зв'язках біфідо- і пропіоновокислих бактерій. Ймовірно, вуглеводи, пропіоновокислих бактерій стимулюють зростання біфідобактерій. Такі висновки підтверджують, як висока кількість життєздатних клітин обох родів в консорціумі - Lg 2-4 • 10¹⁰ КУО/см³, так і вміст вуглеводів біомаси досліджуваних бактерій в монокультурі та в консорціумі (табл. 3.8). Слід зазначити вищий синтез вуглеводів у ПКБ, вміст яких склав 23,39%. Однак при спільному культивуванні кількість вуглеводів зменшувалася приблизно до 16%. Слід зазначити, що в консорціумі B. longum - ЯЗ + P. shermanii - 4 і

B. adolescentis - C52 + *P. shermanii* - 4 вміст вуглеводів було вище, ніж в монокультури біфідобактерій, і склав 18,93% і 18,86%, відповідно.

Таблиця 3.8.

Хімічний склад біомаси бактерій в монокультури та в консорціумі

(N = 3, P ≤ 0,95)

Зразок, №	Мінеральні речовини, %	Білок, %	Ліпіди, %	Нуклеїнові кислоти, %	Вуглеводи, %
<i>B.longum</i> -ЯЗ+ <i>P.shermanii</i> -PS4	4,94	39,76	18,48	17,89	18,93
<i>B.adolescentis</i> -C52+ <i>P.shermanii</i> -PS4	6,98	38,82	18,48	16,86	18,86
<i>P.shermanii</i> -PS4	6,4	33,21	19,21	17,79	23,39
<i>B.longum</i> -ЯЗ	7,89	37,43	18,98	19,75	15,95
<i>B.adolescentis</i> -C52	7,99	37,42	18,88	19,68	15,93

Ці дослідження присвячені вивченню змісту загальних ліпідів і їх жирнокислотного складу як в монокультури, так і в консорціумі біфідо-і пропіоновокислих бактерій. Контролем був зразок середовища культивування без пробіотичних культур.

Аналіз складу жирних кислот в загальній фракції ліпідів показав, що ненасичені ЖК домінували над насиченими у всіх досліджених зразках (рис. 3.15). Поживне середовище приготовано з використанням соєвої сироватки, цим можна пояснити те що, що фракція ПНЖК в контролі була вищою, ніж в досліджуваних зразках і становила 28,80% від суми ЖК.

Після внесення та культивування досліджуваних зразків, кількість ПНЖК варіювало в межах 3,96...23,99 % від суми ЖК. Фракція ПНЖК була відсутня в зразку закваски з використанням *B. adolescentis* - C52 + *P.*

shermanii - 4. Це доводить здатність, досліджених мікроорганізмів, конвертувати лінолеву кислоту.

У всіх досліджуваних заквасках переважала фракція мононенасичених жирних кислот (МНЖК), процентний вміст якої знаходилося в межах від 54,26... 68,42 % від суми ЖК, що в 1,5-2 рази вище значень контролю. Значення контролю було наступним 9,53 %.

Насичені кислоти становили від 14,85 до 27,62% від суми ЖК. Найбільш високий вміст насичених ЖК було в зразку закваски *B.adolescentis* - C52 + *P. shermanii* - 4 і склало 45,73% від суми ЖК.

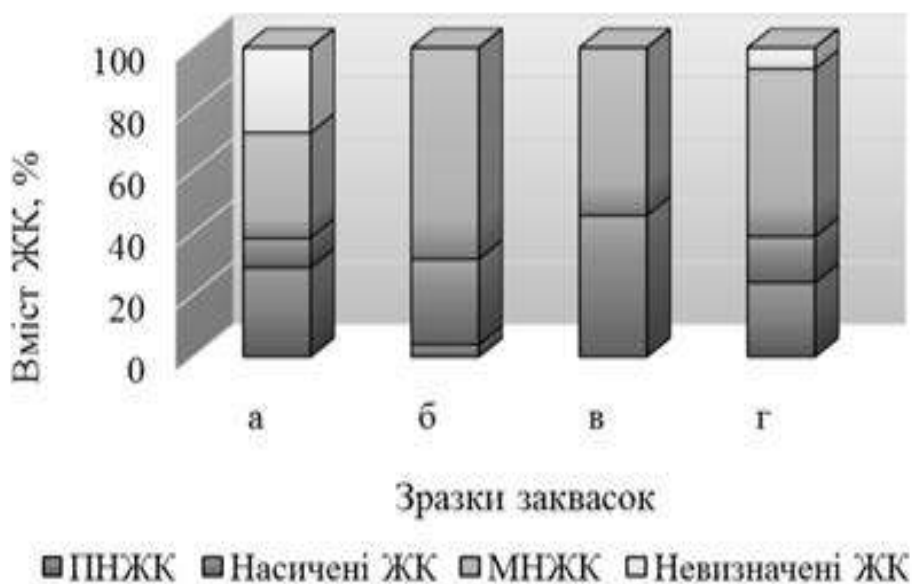


Рис. 3.15. Загальний вміст ЖК в зразках заквасок (в% мас.): а - контрольний зразок, б – *P. shermanii* - 4, в – *B.adolescentis* - C52 + *P. shermanii* - 4, г– *B. longum* - ЯЗ+*P. shermanii* - 4.

Результати дослідження складу ЖК закваски *P. shermanii* - 4 представлені в табл. 3.9. Домінуючими ЖК були пальмітинова кислота (C16: 0) в кількості 20,88% від суми ЖК, олеїнова кислота (C18: 1) - 68,42, а кількість лінолевої кислоти (C18: 2n-6) було мінімальним - 3,96%.

Пальмітинова кислота (C16: 0) і олеїнова кислота (C18: 1) переважали в складі закваски *B. adolescentis* - C52 + *P. shermanii* - 4. Кількість пальмітинової кислоти склало 20,67% від суми ЖК. Зміст олієнової кислоти

в даній заквасці було найбільшим 54,26%. Однак лінолевої кислоти (C18: 2n-6) взагалі не було виявлено (табл. 3.10).

Таблиця 3.9.

Жирнокислотний склад зразка закваски *P. shermani* i- 4

Час, хв	Компонент	Група	Площа	Висота	Концентрація, %
12,940	C16:0 Пальмітинова	Насичені	6021	24009	20,879
14,755	C18:0 Стеаринова	Насичені	1944	617	6,742
14.942	C18:1 Олеїнова	Мононенасичені	19731	926	68,419
15,620	C18:2 Лінолева	Полиненасичені	1142	339	3,961
ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ЖК					
Сума насичених ЖК			27,62 %		
Сумма ненасичених ЖК			72,38 %		

Таблиця 3.10

**Жирнокислотний склад зразка закваски *B. adolescentis* - C52+
P. shermanii -4**

Час, хв	Компонент	Група	Площа	Висота	Концентрація, %
3,434	C6:0 Капронова	Насичені	308	99	5,454
10,429	C14:0 Міристинова	Насичені	285	125	5,051
12.938	C16:0 Пальмітинова	Насичені	1168	473	20,676
14,752	C18:0 Стеаринова	Мононенасичені	413	125	7,30
14,930	C18:0 Стеаринова	Мононенасичені	410	77	7,259
15,062	C18:1 Олеїнова	Мононенасичені	3066	886	54,260
ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ЖК					
Сума насичених ЖК			45,73 %		
Сумма ненасичених ЖК			54,26 %		

Слід зазначити, що серед досліджуваних зразків закваска *B.longum*-ЯЗ + *P. shermanii*- 4 мала максимальну кількість лінолевої кислоти (С18: 2n-6) 23,99 % від загального числа РК. Переважною ЖК була олеїнова кислота (С18: 1) в кількості 54,36 % (табл. 3.11).

Таблиця 3.11.

Жирнокислотний склад зразка закваски *B.longum*-ЯЗ+*P.shermanii*-4

Час, хв	Компонент	Група	Площа	Висота	Концентрація, %
12,945	C16:0 Пальмітинова	Насичені	1367	561	9,958
14,761	C18:0 Стеаринова	Насичені	672	213	4,895
14.945	C18:1 Олеїновая	Насичені	1116	210	8,132
15,071	C18:1 Олеїнова	Мононенасичені	6346	2007	46,227
15,630	C18:2 Лінолева	Полиненасичені	3294	1123	23,997
22,503	Неідентифіцировані ЖК		932	180	6,791
ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ЖК					
Сума насичених ЖК			14,85 %		
Сумма ненасичених ЖК			78,36 %		
Інші			6,79 %		

За результатами експериментальних даних [144, 155] видно, що практично у всіх зразках основними ЖК були С16: 0, С18: 1. Найціннішим складом ЖК характеризувалась закваска симбіотичного консорціуму *B.longum* - ЯЗ і *P.shermanii* - 4. В даному зразку сума ненасичених жирних кислот (78,36 %), була вищою, ніж в інших досліджуваних зразках. Кількість лінолевої кислоти становило 23,99 %. Крім того, за попередніми результатами даних пробіотична закваска консорціуму *B. longum* - ЯЗ і *P. shermanii* - 4 характеризувалася найвищими показниками біохімічної активності, тому її обрано для наступних досліджень.

3.4. Вплив пребіотиків на ріст та розвиток пробіотичних культур

Сьогодні актуальним напрямом досліджень є створення синбіотичних БАД, що складаються з комбінації пробіотиків та пребіотиків, яка забезпечує взаємне посилення впливу на фізіологічні функції та на процеси обміну речовин в організмі людини. Синбіотики сприяють прояву імуногенних властивостей корисних мікроорганізмів за рахунок збільшення продукування ними бактеріальних метаболітів з імуномодуючими властивостями, а також стимулювання нормальної мікробіоти.

Зазвичай використовують біфідо- та лактобактерії у комбінації з такими відомими пребіотиками, як лактулоза та інулін. Хоча в наш час досить фактичних даних, які свідчать про наявність пробіотичних властивостей у пропіоновокислих бактерій, досі не було вивчено вплив вищезазначених пребіотиків на них. Тому було цікавим дослідити динаміку приросту біомаси пропіоновокислих бактерій як в монокультурі, так і у консорціумі з біфідобактеріями за наявності у середовищі лактулози та інуліну.

Для стимулювання росту пропіоновокислих бактерій використовували розчин лактулози концентрацією 2% (виробник Duphalac «Solvay Pharmaceuticals B.V.», The Netherlands). Препарат «Інулін-Нутрімед®» додавали у кількості від 1% до 3%. Необхідне значення рН 7,0 розчину створювали за допомогою 1М NaOH. В якості контролю використовували середовище без додавання пребіотиків. Культивування монокультури проводили протягом 48 год при температурі $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$, а сумісне культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій - протягом 48 год при температурі $(34 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Встановлено, що *Propionibacterium shermanii* - 4 ферментую всі, зазначені вище пребіотики, накопичення мікробної біомаси відбувається поступово (рис. 3.16).

При цьому лактулоза засвоюється пропіоновокислими бактеріями швидше ніж інулін. Перехід від лаг-фази до експоненціальної спостерігали вже після 3 години культивування, що свідчить про швидке пристосування культури бактерій до середовища та умов культивування. Максимальний приріст біомаси пропіоновокислих бактерій було відмічено на 18 годину культивування і сягав $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, проте після 24 години спостерігали зниження кількості популяції мікроорганізмів, що досліджували. При мікроскопії пропіоновокислі бактерії мали форму паличок.

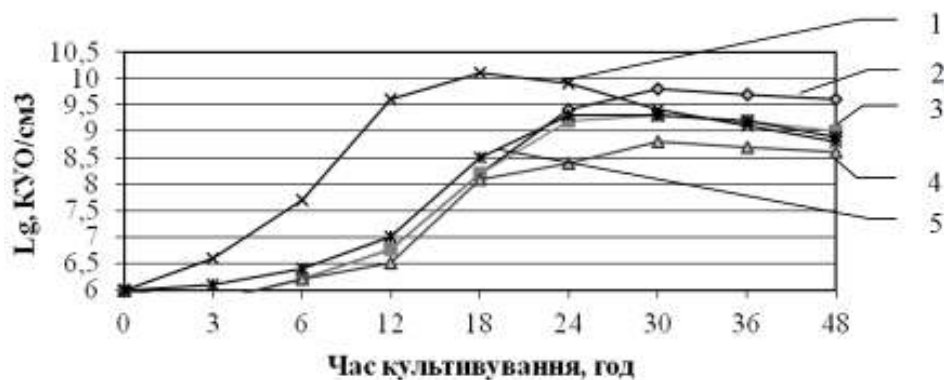


Рис.3.16. Вплив пребіотиків на динаміку росту *P. shermanii* - 4:
1 – лактоза 2 %; 2 – інулін 1 %; 3 – інулін 2 %; 4 – інулін – 3 %;
5 – контроль.

P. shermanii - 4 найкраще ферментував інулін з концентрацією 1%, приріст біомаси збільшувався до $8 \cdot 10^9$ КУО/см³; нижчими показниками характеризувався зразок з додавання 2% інуліну $3 \cdot 10^9$ КУО/см³, які наближались до значення контролю $2 \cdot 10^9$ КУО/см³. В той час, як показники приросту пропіоновокислих бактерій у зразку з додаванням 3% інуліну знижувались до $8 \cdot 10^8$ КУО/см³. При мікроскопії пропіоновокислих бактерій з додаванням інуліну у всіх зразках бактерії мали форму паличок, окрім останнього препарату - пропіоновокислі бактерії з додаванням 3% інуліну набували форми кокоподібних паличок.

Довжина ланцюгу фруктанів інулінового типу впливає на місце і швидкість перетворення фруктанів у кишківнику. Чим довший ланцюг, тим повільніше відбувається перетворення фруктанів в організмі людини, а це

означає, що стимуляція росту бактерій буде відбуватися лише у дистальних відділах ШКТ. Незважаючи на те, що інулін має більш складну хімічну будову, ніж у відомого пребіотика лактулози, досліджувана культура *P.shermani* виявилася здатною активно засвоювати інулін у концентрації 1% через те, що для створення препарату «Інулін-Нутрімед®» виробник використовував високомолекулярний інулін з розгалуженою структурою, який володіє більш вираженою біологічною дією на організм та біодоступністю для культури, що досліджувалась.

Результати дослідів [156] свідчать про можливість ферментування пропіоновокислими бактеріями лактулози з концентрацією 2%, та встановлена пробіотична норма високомолекулярного інуліну для мікроорганізмів, що досліджувались, у кількості 1%.

Наступним кроком стало встановлення впливу обраних концентрацій пребіотиків (лактулози 2%, інуліну 1%) при сумісному культивуванні біфідо- та пропіоновокислих бактерій. Цікавим фактом стало те, що застосування вище зазначених пребіотиків гальмувало розвиток та кінцевий вихід біомаси консорціуму. Це можна пояснити великим антигенним навантаженням. У середовищі у якості джерела вуглеводів використовували лактозу, соєву сироватку, яка містить соєві вуглеводи з вираженими пробіотичними властивостями. Окрім того попередні експериментальні дані свідчать, що синтезовані мікробним консорціумом метаболітні продукти здатні забезпечувати симбіотичні зв'язки між біфідо- та пропіоновокислими бактеріями, серед яких можуть бути пребіотики вуглеводної та не вуглеводної природи.

3.5. Визначення антагоністичної активності вторинних метаболітів

***Propionibacterium shermanii* – 4**

Увага до класичних пропіоновокислих бактерій як до потенційних пробіотиків зумовлюється їх властивостями продукувати антибіотичні

(пропіонідини) та біфідогенні речовини різної природи. Доведено антибіотичну активність пропіонідинів щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів [142].

В одному з експериментальних досліджень по вивченню впливу супернатанта культуральної рідини лактобацил і біфідобактерій і їх інактивованої клітинної форми виявлено, що вони володіють різною швидкістю відновлення кишкового мікробіоценозу. Інактивовані пробіотичні бактерії не зменшували ступінь вираженості дисбіотичних змін в товстій кишці. І тільки надосадова рідина покращує стан мікробіоценозу практично за всіма показниками [157, 158]. Це свідчить, що ефективність пробіотичних препаратів зумовлена продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, тобто екзометаболіти.

Тому було цікаво дослідити аналогічний вплив культуральної рідини, яку отримували при інкубації пропіоновокислих бактерій.

У проведеному нами дослідженні [157] виявили, що у всіх експериментальних зразках після культивування при $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ протягом 24 годин на лактозному середовищі з додаванням різної кількості супернатанту культуральної рідини *P. shermanii* - 4 спостерігався позитивний вплив на збільшення біомаси *B. bifidum* - 1. Зі збільшенням кількості фільтрату, збільшувалась кількість життєздатних клітин біфідобактерій (таб 3.12).

Після введення інокулятів культуральної рідини пропіоновокислих бактерій та біомаси біфідобактерій у співвідношенні 1:1 кількість життєздатних клітин біфідобактерій збільшувалась до $3 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3$. Цей результат був у межах значення контрольного зразка - $1 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3$ – де супернатант замінили на фізіологічний розчин в рівних об'ємах. У другому експериментальному зразку, де інокуляти використовували у співвідношенні 1:1,5 суттєвих змін не було. Кількість біомаси *B. bifidum* - 1 збільшилась лише до $5 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3$. Проте вже у третьому зразку, де співвідношення інокулятів становило 1:2, спостерігали значне збільшення життєздатних клітин у порівнянні з контролем - до $9 \cdot 10^9 \text{ КУО/см}^3$. З подальшим

збільшенням дози фільтрату культуральної рідини *P. shermanii*- 4 біомаса *B. bifidum* - 1 продовжувала збільшуватися, проте вже не так інтенсивно: при співвідношенні 1:2,5 – збільшувалась до $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, при 1:3 – до $2 \cdot 10^{10}$ КУО/см³.

За результатами мікробіологічних результатів [157, 159], рекомендовано використовувати фільтрат *P. shermanii* - 4 у кількості від 2% до 3%, як стимулятор росту біфідобактерій.

Таблиця 3.12.

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

(n=3, P≥0,95)

№ зразка	Співвідношення інокулятів	Кількість життєздатних клітин <i>B. bifidum</i> – 1, КУО/см ³ .
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	$1 \cdot 10^9$

Наступним етапом нашого дослідження було вивчення антагоністичної активності супернатанта культуральної рідини *P.shermanii* – 4. Для прояву антагоністичної активності проти патогенних та умовно патогенних штамів використовували супернатант у кількості 2%, 2,5% та 3%. Такий вибір обумовлений попереднім експериментом, що описаний вище.

Зі збільшенням кількості фільтрату культуральної рідини пропіоновокислих бактерій збільшувалась чутливість патогенних та умовно патогенних штамів (таб 3.12., рис 3.17).

Найбільшу чутливість до вторинних метаболітів *P.shermanii* – 4. виявлено у *Bacillus cereus* - ATCC11778 та *Staphylococcus aureus* - ОНУ223 Розміри зони затримки росту для штаму *Bacillus cereus* - ATCC11778 через 24 години становили $13 \pm 0,5$ мм, 15 ± 1 мм та 16 ± 1 мм за відповідних концентрацій фільтрату 2 %, 2,5 % та 3 %.

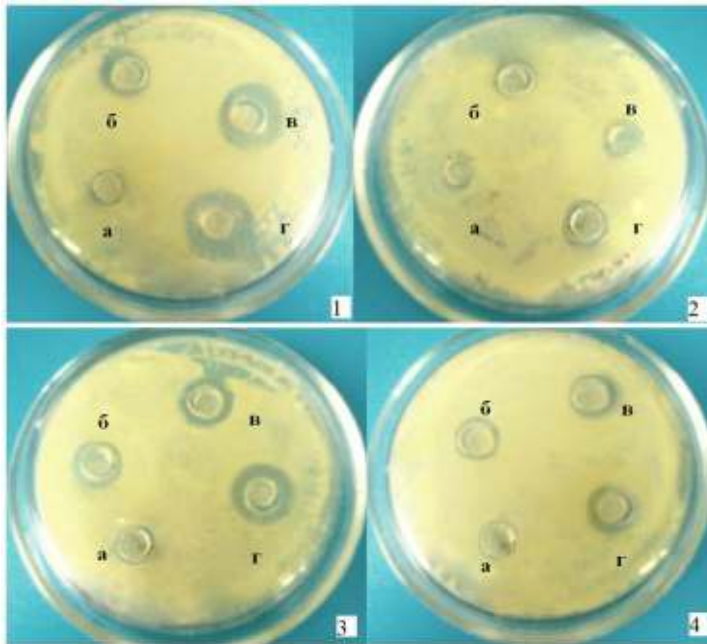


Рис 3.17. Антагоністичний ефект різних концентрацій супернатанта *P.shermanii* -4 на зростання тестових штамів:

1) зони пригнічення росту *Staphylococcus aureus* ОНУ223 з використанням бактеріального супернатанта

в таких концентраціях: а - контроль, б - 2%, в 2, 5%, г - 3%; 2) зони пригнічення росту *Salmonella enteritidis* - ОНУ466 з використанням бактеріального супернатанта в таких концентраціях: а - контроль, б - 2%, в 2,5%, г - 3%; 3) зони пригнічення росту *Bacillus cereus* - ATCC11778 з використанням бактеріального супернатанта в таких концентраціях: а - контроль, б-2%, в - 2,5%, г - 3%; 4) зони пригнічення росту *Escherichia coli* - ATCC25922 з використанням бактеріального супернатанта в таких концентраціях: а - контроль, б - 2%, в - 2,5%, г - 3%

Для штаму *Staphylococcus aureus* - ОНУ223 зони затримки були найбільшими від $16 \pm 0,5$ мм до 17 ± 1 мм. Штам *Escherichia coli* - ATCC25922 виявився менш чутливим до метаболітів *P.shermanii* – 4. Зони пригнічення росту цього мікроорганізму були наступними 9 ± 1 мм, $10 \pm 0,5$ мм та 12 ± 1 мм за відповідних концентрацій. При дослідженні впливу супернатанта нечутливими до метаболітів пропионовокислих бактерій був штам *Salmonella enteritidis* - ОНУ466. Проте на газоні *Salmonella enteritidis* - ОНУ466 додаванням у лунку 3% супернатанта було зареєстровано наявність незначної зони затримки росту діаметром 2 ± 1 мм (табл. 3.13).

Пропіоновокислі бактерії відомі своєю здатністю до продукування пропионової кислоти, яка через свою антимікробну та антигрибкову

активність використовується, як захист від мікробного псування харчових продуктів. До вторинних метаболітів пропіоновокислих бактерій належать бактеріюцини, що представлені антимікробними пептидами чи білками, які проявляють антагоністичну активність до патогенних та умовно патогенних штамів [142].

Таблиця 3.13.

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

(n=3, P≥0,95)

Кількість супернатату, %	Зони пригнічення росту тест-культур, мм			
	Bacillus cereus - ATCC11778	Staphylococcus aureus - ОНУ223	Escherichia coli- ATCC25922	Salmonella enteritidis 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

У дослідженні [157] продемонстровано, що за присутності фільтрату культуральної рідини P. shermanii - 4 у різній кількості, відбувалась затримка росту Escherichia coli- ATCC25922, Staphylococcus aureus ОНУ-223, Bacillus cereus ATCC11778. Можна припустити, що антагоністична активність штаму P. shermanii - 4, зумовлена накопиченням антимікробних сполук. Накопичення цих антимікробних речовин у культуральній рідині дозволяє використовувати її, як сировину для створення пробіотику метаболічного типу.

**3.6. Визначення вмісту 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти в
культуральній рідині Propionibacterium shermanii – 4.**

Біфідогенна активність пропіоновокислих бактерій зумовлюється продукуванням 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти (DHNA), 2-аміно-3-карбоксі-1,4-нафтохінону (ACNQ) та дещо менше коротколанцюговими

жирними кисло- тами, котрі водночас є інгібіторами грамнегативних факультативних і облігатних анаеробів [142, 160].

Культуральна рідина – це продукт відходу в традиційній технології виробництва бактеріальних препаратів або концентратів. Вона містить в собі метаболітні продукти життєдіяльності пробіотичних бактері і може бути використана, як основа безклітинної форми пробіотика. Її утилізація, як відходу виробництва, призводить до значних економічних втрат і до забруднення навколишнього середовища. Використання культуральної рідини пробіотичних мікроорганізмів з метою створення метабіотика є інноваційним напрямком при розробці безвідходного виробництва пробіотичних препаратів.

У попередньому дослідженні [157] було продемонстровано позитивний вплив супернатанта *Propionibacterium shermanii* - 4 на збільшення біомаси біфідобактерій. Тому перед нами постала мета довести, що біфідогенний ефект *Propionibacterium shermanii* - 4 зумовлений наявністю DHNA у культуральній рідині.

Стимуляція росту біфідобактерій за допомогою 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти 2-аміно-3-карбокси-1,4-нафтохінону заснована на механізмі, який абсолютно відрізняється від механізму стимуляції росту біфідобактерій олігосахаридами. Найважливішими функціями біфідогенного стимулятора (БГС) є можливість проникнення через мембрану клітини в цитозоль біфідобактерій для здійснення функції електронного акцептора за участі фермента діафрази – цитозольний гомодимерний флавопротеїн. Діафраза приймає участь у низці біохімічних реакцій клітини. Найважливішою, з яких є одноступеневе двуелектронне відновлення хінонів до гідрохінонів. Екзогенне окислення NADH за допомогою БГС призводить до генерації пірувату і зменшення виробництва лактату. DHNA є попередником менахінону (вітамін K₂), та є більш сильним стимулятором росту біфідобактерій, ніж ACNQ. Цікаво відзначити, що DHNA має позитивні ефекти не тільки для біфідобактерій, а й для людини. У

дослідженні [161], автори повідомляють, що DHNA здійснює відновлення мікробіоценозу товстої кишки не тільки шляхом балансування мікробіоти кишечника, але і шляхом придушення інфільтрації лімфоцитів шляхом відновлення молекули адгезії слизової оболонки 1 (MAdCAM-1).

Ідентифікацію DHNA проводили шляхом порівняння часу утримання речовин, що визначали, з часом утримання стандартного маркера DHNA. Був зареєстрований пік при утриманні часу на 25,8 хв. Кількість DHNA склала 0,67 мг / мл (рис 3.18).

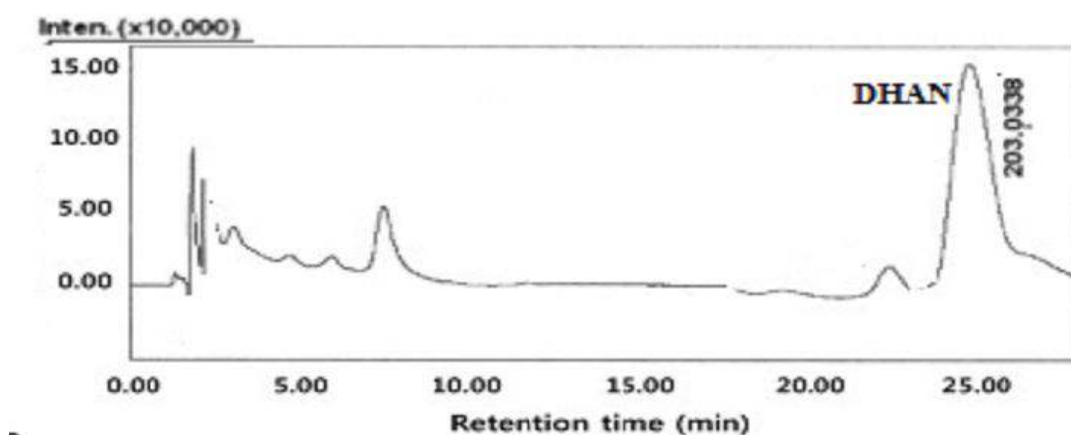


Рис. 3.18. ВЕРХ 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти в супернатанті монокультури *P. shermanii* - 4

Отримані експериментальні дані [160] свідчать про доцільність застосування супернатанта культуральної рідини *P. shermanii* - 4 як для створення пробіотики метаболітного типу, так і для конструювання поліштамового синбіотики, використовуючи DHNA як пребіотик не вуглеводної природи.

3.7. Дослідження властивостей консорціуму біфідо - та пропіоновокислих бактерій в умовах *in vitro*

Пробіотичні бактерії в процесі проходження через відділи шлунково-кишкового тракту (ШКТ) зазнають вплив агресивного середовища, а саме: дія

кислого середовища шлунку, рН якого у межах від 2 до 3; вплив жовчі та різних гідролітичних ферментів у дванадцятиперстній кишці. Для визначення ступеню виживання консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій у ШКТ проведено низку дослідів в умовах *in vitro*, в яких імітовано умови середовища відділів ШКТ. Слід зазначити, що культури консорціуму були у незахищеному стані, одразу після культивування.

Резистентність консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій до низьких значень рН проводили шляхом інкубації зразків монокультури біфідо- та пропіоновокислих бактерій та зразка, який був отриманий за сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій з подальшою інкубацією протягом 3 годин в середовищі підкисленому до значень рН 2. Температура експозиції становила 37 °С. Таким чином були відтворені штучні умови шлунку. Проби відбирали через 0, 1, 2, та 3 години після початку дослідів. Після чого визначали кількість мікроорганізмів, що вижили в умовах «штучного» середовища шлунку.

На рисунку 3.19. представлені результати досліджень виживання біфідобактерій в умовах кислого середовища «штучного» шлунку при значенні рН 2.

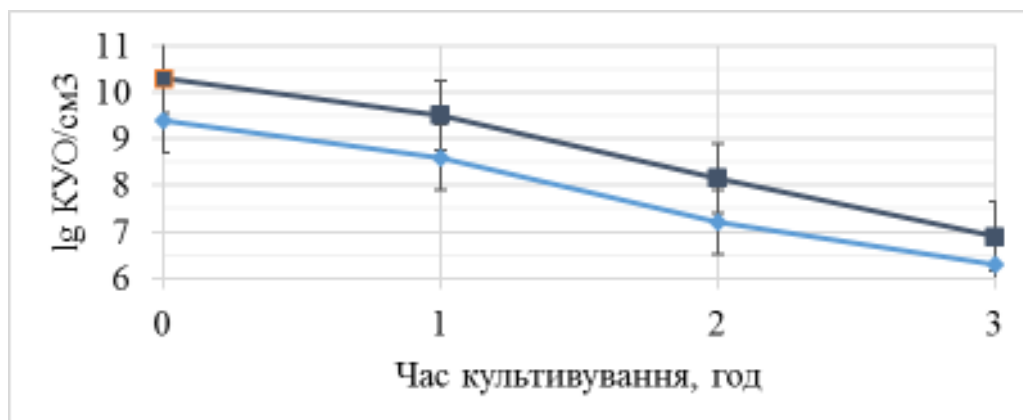


Рис. 3.19. Резистентність біфідобактерій до рН 2: 1 – монокультура *B. longum*-1; 2 - *B. longum*-ЯЗ, які були отримані при сумісному культивуванні з пропіоновокислими бактеріями.

Оскільки на початку експозиції кількість життєздатних клітин монокультури біфідобактерій становила $4 \cdot 10^9$ КУО/см³, а кількість біфідобактерій у консорціумі - $3 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, то зниження кількості життєздатних бактерій порівнювали з початковими показниками.

За результатами досліджень, було виявлено, що через 1 годину кількість біфідобактерій знизилась в 6 разів у порівнянні з показниками на початку експозиції як в монокультурі, так і у консорціумі, і становила $6 \cdot 10^8$ КУО/см³ та $5 \cdot 10^9$ КУО/см³ відповідно. Експозиція в 2 години показала синхронне зниження кількості життєздатних клітин в обох зразках, яке було в 20 разів менше за початкові показники і становили $2 \cdot 10^7$ КУО/см³ та $1,5 \cdot 10^8$ КУО/см³ відповідно. Перебування монокультури біфідобактерій протягом 3 годин в кислому середовищі зі значенням рН 2 призводило до значної гибелі, при цьому кількість життєздатних клітин зменшилась на 38% у порівнянні з початковим їх значенням, і становило $3 \cdot 10^6$ КУО/см³. В той час як кількість біфідобактерій, які були у консорціумі з пропіоновокислими бактеріями, зменшилась на 30% у порівнянні з початковим значенням, і становила $9 \cdot 10^6$ КУО/см³.

На рисунку 3.20. представлені результати досліджень виживання пропіоновокислих бактерій в умовах *in vitro* у кислому середовищі шлунка.

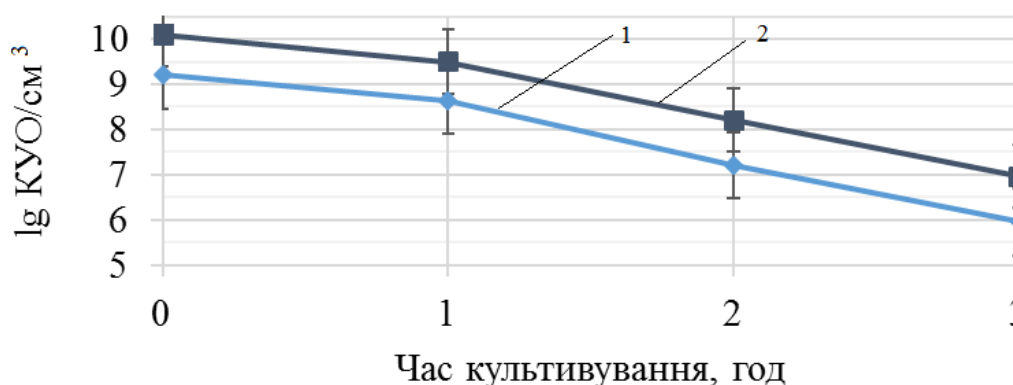


Рис. 3.20 Резистентність пропіоновокислих бактерій до рН 2: 1 – монокультура *P.shermanii* - 4; 2 – *P.shermanii* - 4, які були отримані при сумісному культивуванні з біфідобактеріями.

На початку експозиції кількість життєздатних клітин монокультури пропіоновокислих бактерій становила $2 \cdot 10^9$ КУО/см³, а кількість пропіоновокислих бактерій у консорціумі – $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³. Зміну показників життєздатних бактерій порівнювали з початковими значеннями.

Через 1 годину культивування кількість пропіоновокислих бактерій становила $6,5 \cdot 10^8$ КУО/см³ та $5 \cdot 10^9$ КУО/см³ відповідно. На 2 годині інкубації було виявлено, що кількості життєздатних клітин в обох зразках, яке було в 22 рази менше за початкові показники і становили $2 \cdot 10^7$ КУО/см³ та $2 \cdot 10^8$ КУО/см³ відповідно. Перебування протягом 3 годин в кислому середовищі зі значенням рН 2 призводило до значної гибелі. Кількість життєздатних клітин монокультури пропіоновокислих бактерій на 3 годині експозиції в кислому середовищі зі значенням рН 2 зменшилась на 40 % у порівнянні з початковим їх значенням, і становило $9,5 \cdot 10^5$ КУО/см³. В той час як кількість пропіоновокислих бактерій, які були у консорціумі з біфідобактеріями, зменшилась на 32% у порівнянні з початковим значенням, і становила $9,6 \cdot 10^6$ КУО/см³.

Отримані результати даних свідчать про те, що пропіоновокислі бактерії у порівнянні з біфідобактеріями більш чутливі до умов шлунку. Кращу пристосованість, яка забезпечує зниження рН. У зв'язку з цим біфідобактерії краще пристосувалися до умов зниженого рН.

Наступним кроком було дослідження резистентності бактерій роду *Propionibacterium* та *Bifidobacterium* до 40 % розчину жовчі в умовах *in vitro*.

Виживання монокультур та консорціуму в середовищі жовчі з масовою часткою 40% при зміщенні значень до рН 8 .. 9 проводили протягом протягом 3 годин при температурі 37С. Кількість життєздатних мікроорганізмів визначали шляхом підрахунку колоніє утворюючих одиниць.

На рис. 3.21. представленні дані про те, що резистентність клітин біфідобактерій до дії 40 % розчину жовчі поступово знижувалась.

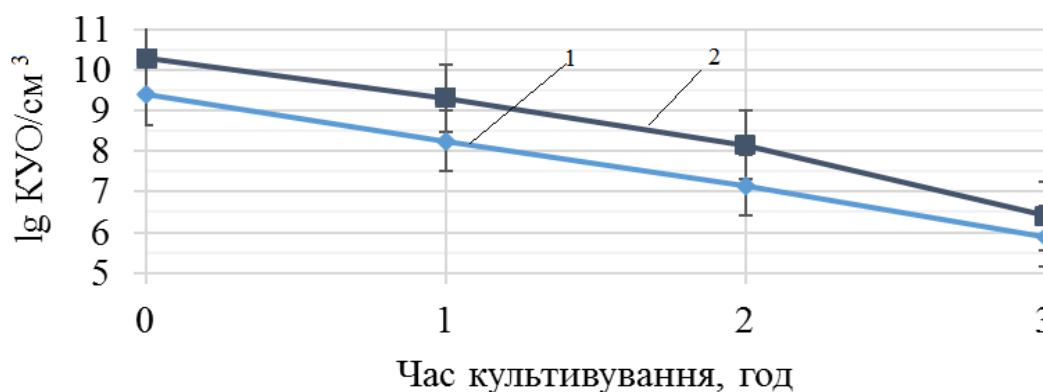


Рис. 3.21. Резистентність біфідобактерій до рН 9: 1 – монокультура *B. longum*; 2 - *B. longum*, які були отримані при сумісному культивуванні з пропіоновокислими бактеріями.

Після 1 години інкубації кількість клітин у монокультурі становила $3.2 \cdot 10^8$ КУО/см³. Після 2 години культивування цей показник знизився и становив $1.2 \cdot 10^7$ КУО/см³. Через 3 години кількість клітин у монокультурі біфідобактерій скоротилася на 43% і становила $9 \cdot 10^5$ КУО/см³, а в консорціумі – на 38%, що становило $4 \cdot 10^6$ КУО/см³.

Резистентність пропіоновокислих бактерій до умов лужного середовища рН 9 в умовах шлунку *in vitro* зображено на рисунку 3.22.

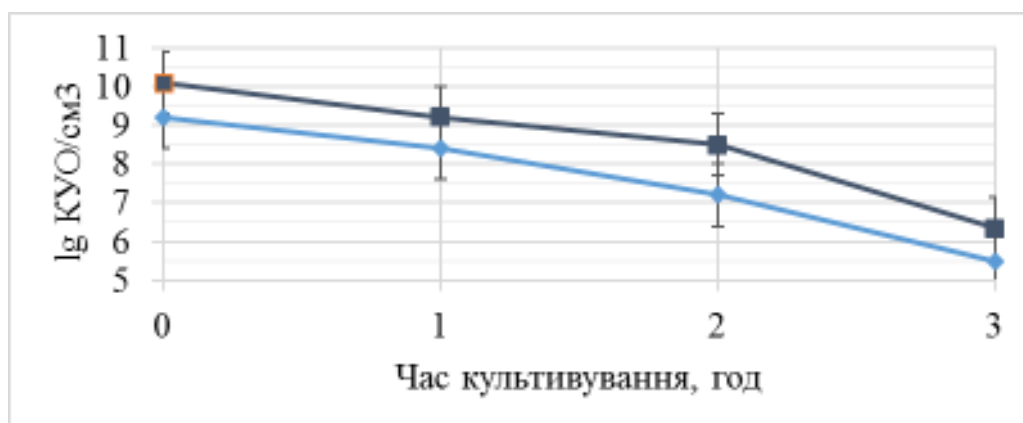


Рис. 3.22. Резистентність пропіоновокислих бактерій до рН 9: 1 – монокультура *P. shermanii-4*; 1 - *P. shermanii-4*, які були отримані при сумісному культивуванні з біфідобактеріями.

Через 1 годину культивування кількість пропіоновокислих бактерій в монокультури становила $4 \cdot 10^8$ КУО/см³, а консорціумі $2 \cdot 10^9$ КУО/см³. На 2 годині інкубації було виявлено, що кількості життєздатних клітин в обох зразках, яке було в 20 разів менше за початкові показники і становили $2 \cdot 10^7$ КУО/см³ та $5 \cdot 10^8$ КУО/см³ відповідно. Перебування протягом 3 годин в лужному середовищі зі значенням рН 9 призводило до зменшення кількості життєздатних клітин монокультури пропіоновокислих бактерій на 46 % у порівнянні з початковим їх значенням, і становило $5 \cdot 10^5$ КУО/см³. В той час як кількість пропіоновокислих бактерій, які були у консорціумі з біфідобактеріями, зменшилась на 41 % у порівнянні з початковим значенням, і становила $3,5 \cdot 10^6$ КУО/см³. Слід зазначити, що при мікроскопії зразків монокультури *P.shermanii* була дещо змінена морфологія. Клітини мали вигляд не паличок, а набували коркоподібної форми, що свідчить про несприятливі умови для розвитку клітин

При дослідженні впливу кислотного середовища рН 2 та 40 % розчину жовчі було виявлено, що резистентність бактерій, що перебували в симбіотичному консорціумі була вищою за резистентність монокультур біфідо- та пропіоновокислих бактерій. При цьому у досліді з використанням 40 % розчину жовчі візуально спостерігалася зміна в формі і структурі гранул. Структура клітин обох родів була менш міцною, а форма пропіоновокислих бактерій стала більш сферичною. За літературними даними [98, 104], бактерії роду *Propionibacterium* синтезують ліпіди та вуглеводи які здатні захистити від дії несприятливих умов (вплив деяких антибіотиків, дії шлункового соку, жовчі та гідролітичних ферментів) як власну популяцію, так і популяцію бактерій, з якими вступають в симбіотичні зв'язки. Саме цим можна пояснити більш високу резистентність бактерій у консорціумі, ніж в монокультурах в умовах агресивного середовища ШКТ.

У роботі також проводили дослідження резистентності біфідо- та пропіоновокислих бактерій за несприятливих умов ШКТ, що попередньо

знавали процесів сублімаційного сушіння. Процес сублімаційного сушіння біомаси, змішаної із захисним середовищем яке містить наступні компоненти, % : сахарозу – 50, желатозу – 25, молоко – 25, здійснювали із використанням сублімаційних сушарок ТГ-15.

Отриману суху біомасу консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій розчиняли у сретильному фізіологічному розчині з подальшою інкубацією за температури 37°C послідовно в кислому модельному середовищі (рН 2) і лужної модельному середовищі (рН 7,2). На початку експозиції кількість життєздатних клітин монокультур біфідо- та пропіоновокислих бактерій становила не менше $1 \cdot 10^9$ КУО/см³, а в консорціумі – не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, то зниження кількості життєздатних бактерій порівнювали з початковими показниками

Кількість життєздатних пробіотичних мікроорганізмів консорціуму (КУО/см³) визначали на початку експерименту (0 год), через 4 год інкубації в кислому модельному середовищі з ацидин-пепсином і через 12 год інкубації в лужному модельному середовищі. Результати експериментальних досліджень представлені в таблиці 3.14.

Таблиця 3.14

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

(n=3, P≥0,95)

Пробіотична культура	Вміст живих бактерій у зразку, КУО/см ³		
	0 год	4 год	12 год
Монокультура <i>B.longum</i> - ЯЗ	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^5$
<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	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^5$
<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 монокультури знижувалося на два порядки в порівнянні з початковим числом, а в консорціумі бактерій на один порядок, і в лужному середовищі – ще два порядки. Слід також відмітити, що здатність до виживання у захищених культур консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій була вищою, ніж у незахищених біфідо- і пропіоновокислих бактерій, оскільки вони не були змішані з захисним середовищем (що містило наступні компоненти, %: сахарозу – 50, желатозу – 25, молоко – 25).

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/ см³. Також було встановлено дещо вищу резистентність як біфідо- так і пропіоновокислих бактерій в складі консорціуму, ніж в монокультури, що можна пояснити синтезованими метаболітами, які створюють захисний бар'єр від агресивного середовища шлунково-кишкового тракту.

Таким чином, отриманий комплекс, який складається з симбіотичного консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій та їх метаболітів, які призводять до збільшення резистентності пробіотичних мікроорганізмів, що забезпечує їх захист в умовах шлунково-кишкового тракту. Результати представлених експериментальних даних є основою для отримання біологічно активної добавки пробіотичного та синбіотичного характеру.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

Для отримання якісної біомаси пробіотичних мікроорганізмів в необхідній кількості, було розроблено поживне середовище для сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій, яке містить стимулятор росту рослинного походження, а саме соєву сироватку у кількості 3 %.

Було вивчено динаміку росту бактерій родів *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* на розробленому соєво-лактозному середовищі. Експериментальним шляхом визначено ризими сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій, а також досліджено жирнокислотний склад цих пробіотичних мікроорганізмів як в монокультурі, так і у консорціумі. За культуральними та біохімічними показниками було обрано штами *B. longum* - ЯЗ та *P. shermanii* – 4 для подальших досліджень з метою створення ефективного біокоректора.

За результатами експериментальної роботи було визначено позитивний вплив на приріст пропіоновокислих бактерій таких відомих пребіотиків як лактулоза та інулін у кількості 2 % та 1 % відповідно. Проте у консорціумі бактерій родів *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* зазначена кількість вищезгаданих пребіотиків дещо гальмувало приріст біомаси пропіоновокислих бактерій, оскільки у приготуванні поживного середовища використовували соєву сироватку з вираженими пребіотичними властивостями. Тому для створення синбіотичної біологічної добавки у якості пробіотиків використовували штами *B. longum* - ЯЗ та *P. shermanii* – 4, а соєва сироватка відігравала роль пребіотика.

Було досліджено антагоністичний вплив культуральної рідини пропіоновокислих бактерій по відношенню до патогенних та умовнопатогенних мікроорганізмів. Найбільш чутливим до вторинних метаболітів *P. shermanii* – 4 були штами *Bacillus cereus* - ATCC11778 та *Staphylococcus aureus* - ОНУ223.

У ході дослідницької роботи виявлено стимулюючу дію супернатанту пропіоновокислих бактерій у кількості від 2 до 3 мл на ріст та розвиток

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 самостійного функціонального інгредієнту 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, оскільки синтезовані метаболіти створюють захисний бар'єр від агресивного середовища шлунково-кишкового тракту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

137. 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.

138. 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.

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

140. 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 № u 2015 11451; заявл. 29.01.2016; опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12.

141. Капрельянц Л.В., Крупицкая Л.О. Пробиотичних комплекс з пропіоновокислими 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.

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

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

144. 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.

145. Киселева М.А. Метаболизм мембранных липидов у свободноживущих и симбиотических зеленых водорослей рода *Pseudocostocoma* в условиях дефицита фосфора: Автореф дис. ... канд. биол. наук. С. Пб., 2008. 23 с.

146. Титов, В.Н. Синтез насыщенных, моноеновых, ненасыщенных и полиеновых жирных кислот в филогенезе. Эволюционные аспекты атеросклероза // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132, № 2. С. 181–199

147. Athalye S. K. Production of Eicosapentaenoic acid from biodiesel derived crude glycerol using fungal culture : дис. : Virginia Polytechnic Institute and State University, 2008.

148. Benjamin S., Spener F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits // Nutrition & Metabolism. 2009. Vol. 6. №. 1. P. 1-36.

149. Цуркан Я. С. Селекция микроорганизмов с высоким содержанием практически значимых полиненасыщенных жирных кислот : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. філос. наук : спец. 6D070100 "биотехнология" / Цуркан Я. С. : Алматы, 2015. 150 с.

150. Vahvaselkä M., Laakso S. Production of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in camelina meal and okara by an oat-assisted microbial process. // Journal of agricultural and food chemistry. 2010. Vol. 58, №. 4. P. 2479-2482.

151. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products—a review. / R. Sieber et al // International Dairy Journal. 2004. Vol. 14, №. 1. P. 1-15.

152. Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* [Text] / L. Wang et al // Food Chemistry. 2007. Vol. 103, №. 2. С. 313-318.

153. Zárate G. Dairy Propionibacteria: Less Conventional Probiotics to Improve the Human and Animal Health. // INTECH Open Access Publisher, 2012. Режим доступа: <http://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/dairy-propionibacteria-less-conventional-probiotics-to-improve-the-human-and-animal-health>
154. 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.
155. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В. [Жирнокислотний склад біологічно активних добавок з включенням пропіоновокислих бактерій](#) // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. №. 73. С. 143-149.
156. Крупицька Л.О. Вплив пребіотиків різної природи на приріст біомаси пропіоновокислих бактерій. // Збірник наукових праць молодих учених. Аспірантів та студентів, Одеса. 2016р. С. 71.
157. Krupytska 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.
158. Пробиотики: вектор развития / И. Ю. Чичерин и соавт. // Практическая медицина. 2012. Т. 3. С. 180-188
159. 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.
160. 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.

161. Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains / T. Kouya et all
//Journal of bioscience and bioengineering. 2007. Vol. 103, No.5. P. 464-471

РОЗДІЛ 4

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ СИНБІОТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК

Результати досліджень, які були викладені у розділі 3, дали змогу розробити технологію отримання синбіотичних біологічно активних добавок і показали принципіальну можливість використання культуральної рідини пробіотичних мікроорганізмів для створення без клітинних функціональних інгредієнтів з вираженими пребіотичними властивостями.

Наступним етапом для реалізації поставленої мети була проведена оптимізація основних параметрів біотехнології отримання синбіотичних біологічно активних добавок, промислова апробація та розробка технології їх отримання, розрахунок економічної собівартості впровадження технологічної схем отримання продуктів, розробка нормативної документації.

4.1. Оптимізація умов культивування біфідо-та пропіоновокислих бактерій

Метою роботи був підбір оптимальних умов культивування, які б дали можливість отримати максимальний вихід біомаси симбіотичного консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій та створення на їх основі біологічно активної добавки.

У роботі використовували музейні культури ОНАХТ кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування *Bifidobacterium longum* - ЯЗ та *Propionibacterium shermani* - 4. Культивування біфідобактерій проводили на соєво-лактозному середовищі. Інокулят добових культур вносили в колбу з середовищем у співвідношенні 1:1 з подальшим культивуванням при температурі від 30 °С до 37 °С.

На початковому етапі досліджень визначали оптимальні умови для накопичення біомаси біфідо- та пропіоновокислих бактерій у замкнутій системі (у колбі).

Умовно вихід біомаси симбіотичного консорціуму позначимо «В», значення якого виражаємо у КУО/см³ і залежить від реакції середовища, температури та часу культивування :

$$B = B(t, pH, T), \text{ КУО/см}^3 \quad (1),$$

де В – вихідна біомаса, КУО/см³; t – год; pH – реакція кислотного потенціалу, Т – температура, °С.

У таблиці 4.1. представлена зміна показників накопичення біомаси та зміна реакції середовища під час інкубації протягом 72 год при різних температурних режимах (Т = 30 °С, Т = 34 °С, Т = 37 °С):

Таблиця 4.1.

Зміна показників культивування за різними температурними режимами

Температура Т = 30 °С			Температура Т = 34 °С			Температура Т = 37 °С		
Час , (год)	Кількість клітин, КУО/см ³	pH	Час , (год)	Кількість клітин, КУО/см ³	pH	Час , (год)	Кількість клітин, КУО/см ³	pH
0	6	7	0	6	7	0	6	7
3	6,2	6,9	3	6,2	6,9	3	6,3	6,6
6	6,5	6,7	6	6,7	6,7	6	6,5	6,5
9	7,0	6,5	9	7,9	6,5	9	7,1	6,0
12	8,0	6,2	12	8,8	5,9	12	8,0	5,7
15	8,5	6,0	15	9,7	5,5	15	8,5	5,1
18	9,0	5,7	18	10,5	5,3	18	8,9	4,8
21	9,0	5,6	21	10,6	5,2	21	9,2	4,6
24	9,0	5,5	24	10,7	5,1	24	9,3	4,5
27	9,0	5,45	27	10,7	5,1	27	9,3	4,5
30	9,0	5,2	30	10,7	5,0	30	9,3	4,45
33	8,9	5,15	33	10,6	5,0	33	9,2	4,4
36	8,8	5,1	36	10,5	4,9	36	9,0	4,37
39	8,8	5,1	39	10,5	4,9	39	9,0	4,35
42	8,8	5,05	42	10,4	4,85	42	8,9	4,3
48	8,7	5,0	48	10,4	4,8	48	8,8	4,29
60	8,6	4,9	60	10,1	4,7	60	8,6	4,25
72	8,4	4,7	72	9,8	4,5	72	8,5	4,23

В основу визначення оптимальних параметрів сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій була покладена багатофакторна регресійна модель, яка базується на статистичній обробці експериментальних даних, які наведені в таблиці 4.1.

Статистична обробка цих даних була проведена в середовищі програмного продукту регресійного моделювання (метод найменших квадратів) Table Curve 3D [162], а залежність від температури визначали рішенням відповідної задачі квадратичної інтерполяції.

Статистичний аналіз експериментальних даних дослідження встановив, що змінні (B, t, T) і (pH, B) є кореляційними, а змінні (B, pH, t, T) та (pH, t, T) не є кореляційно залежними (коефіцієнт детермінації $r^2 \approx 0$).

Тобто регресійна модель опису отриманих даних зводиться до двох функціональних залежностей:

$$B = B(t, T) \quad (2),$$

$$pH = pH(B, T) \quad (3).$$

Згідно з отриманими моделями візуальне спостереження змін показників культивування (табл. 4.1) встановило, що весь період зростання популяцій мікроорганізмів ($0 \leq t \leq 72$ год) при періодичному культивуванні можливо представити чотирма періодами (фази росту і розмноження бактеріальних клітин:

1) період адаптації – пристосування до умов культивування (5-6 годин за експериментальними даними); початкова фаза, охоплює проміжок часу від моменту висівання бактерій в живильне середовище й до досягнення максимальної швидкості росту (лаг – фаза)

2) період активного розмноження бактерій (фаза експоненціальна чи лог фаза): період у проміжку від 7 год до 23 год, який завершується виходом популяційної системи на максимальну щільність чисельності мікроорганізмів *B. longum* - 43 та *P. shermanii* - 4 (7,5 - 24 годин); внаслідок інтенсивного

розмноження клітин відбувається швидко поглинання поживних речовин середовища культивування.

3) стаціонарний період (24 – 30 годин), який характеризується рівноважним станом системи, в цей проміжок часу кількість клітин, що зазнали гибелі прямо пропорційний кількості клітин, що розмножуються, за рахунок чого кількість життєздатних мікроорганізмів протягом 6 годин є сталою величиною; ця фаза характеризується максимальною величиною біомаси і життєдіяльністю мікробної популяції.

4) період зниження популяції бактерій (фаза відмирання) за експериментальними даними знаходиться в залежності від кислотно-лужного потенціалу середовища (зі збільшенням кислотності середовища чисельність популяції зменшується) (31 – 72 години). У цій фазі відмирання бактерій переважає над розмноженням, зростає гетерогенність культур тощо. Такий стан бактеріальної популяції зумовлюється зміною фізико-хімічних властивостей поживного середовища (зниження pH) та іншими несприятливими чинниками.

Тобто спостерігається типова схема росту бактеріальних культур в якій нами виділяється ще й фаза виживання, яка характеризується наявністю окремих клітин, що збереглися протягом певного часу в умовах загибелі більшості клітин мікробної популяції. Висівання клітин *B. longum* - ЯЗ та *P. shermanii* - 4 на свіже поживне середовище показало, що вони зберегли здатність після лаг-фази активно рости і розмножуватись.

Далі перейдемо до математичного опису окремих періодів культивування *B. longum* – ЯЗ та *P. shermanii*-4.

Період адаптації ($0 \leq t < 8$). Для цього періоду в основу регресійного моделювання покладена біологічна модель зростання популяції Т. Мальтуса [162]

$$\frac{\partial B}{\partial t} = kB, \quad B(t) = B_0 \exp(kt), \quad (4),$$

де B_0 – це початкова кількість клітин.

Залежність щільності чисельності системи біфідо- та пропіоновокислих бактерій $B = B(t, T)$ (КУО/см³) від часу (t) і температури (T) (5) (регресійна модель) має вигляд

$$B = B_0 \exp [k(T) \cdot t], \quad (5.1)$$

де $k(T) = -0,0003279 \cdot T^2 + 0,0219 \cdot T - 0,3531$.

Коефіцієнт детермінації майже дорівнює 1, що свідчить про достовірність даних: $r^2 = 0,99$

Залежність показника активної кислотності середовища (pH) від щільності чисельності бактерій (B) і від температури (T) має вигляд регресійної моделі:

$$pH = \exp(a(T) + b(T) \cdot B), \quad (5.2)$$

де

$$a(T) = 0,03168 \cdot T^2 - 2,068 \cdot T + 35,99,$$

$$b(T) = -0,005289 \cdot T^2 + 0,3451 \cdot T - 5,68.$$

Коефіцієнт детермінації майже дорівнює 1, що свідчить про достовірність даних: $r^2 = 0,998$

Наступний період характеризується активним розмноженням консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій ($8 \leq t < 25$ годин), тобто це період експоненціальної фази росту бактерій. Перш за все відповідно до математичних моделей (5.1) - (5.2) визначаємо значення $pB(t)$ і $pH(t)$ в момент завершення адаптаційного періоду $t = 7,5$ годин для різних значеннях температур: $T_1 = 30^\circ\text{C}$, $T_2 = 34^\circ\text{C}$, $T_3 = 37^\circ\text{C}$.

Маємо (початкові умови):

$$\text{при } T_1 = 30^\circ\text{C} \quad B = 6,4089, \quad pH = 6,71;$$

$$\text{при } T_1 = 34^\circ\text{C} \quad B = 6,5872, \quad pH = 6,67;$$

$$\text{при } T_1 = 37^\circ\text{C} \quad B = 6,3947, \quad pH = 6,50.$$

Для біфідо- та пропіоновокислих бактерій згідно регресійній моделі рівняння зростання визначали кінетичними рівняннями

$$B = a + \frac{bc}{d - c} (e^{-cx} - e^{-dx}) \quad (6.1)$$

Або в диференціальній формі $B = B_1 + B_2 + B_3$

$$\begin{aligned} \frac{dB_1}{dt} &= 0, & \frac{dB_2}{dt} &= -cB_2, & \frac{dB_3}{dt} &= -dB_3 \\ B_1 &= a, & B_2 &= \frac{bc}{c - d} e^{-ct}, & B_3 &= \frac{bc}{c - d} e^{-dt}, \end{aligned}$$

$$\text{де } a = 0,09113 \cdot T^2 - 5,942 \cdot T + 95,17,$$

$$b = -0,4248 \cdot T^2 - 28,31 \cdot T + 456,3,$$

$$c = 0,003615 \cdot T^2 - 0,2446 \cdot T + 4,25,$$

$$d = 0,000642 \cdot T^2 - 0,042855 \cdot T + 0,7067.$$

При цьому коефіцієнт детермінації дорівнює майже 1 ($r^2 = 0,96$).

Залежність лужно-кислотного показника розчину pH від щільності чисельності бактерій (B) і від температури (T) (2) має вигляд регресійної моделі:

$$\frac{dpH}{dB} = b \cdot B \quad (6.2),$$

$$pH = \exp(a(T) + b(T) \cdot B) \quad (6.3),$$

де

$$a(T) = 0,01469 \cdot T^2 - 0,9396 \cdot T + 17,33,$$

$$b(T) = -0,002772 \cdot T^2 + 0,1781 \cdot T - 2,919.$$

При цьому коефіцієнт детермінації дорівнює майже 1 ($r^2 = 0,98$)

У період від 24 год до 42 год культивування спостерігали стаціонарну фазу. Залежність $B = B(t, T)$ для стаціонарного періода відповідно регресійної моделі визначається рівнянням:

$$B = a + \frac{bc}{c - d} (e^{-dt} - e^{-ct}), \quad (7.1).$$

При цьому залежність коефіцієнтів a , b , c , d від температури (T) мають вигляд (розв'язується задача квадратичної інтерполяції):

$$a = -0,105 \cdot T^2 + 5,999 \cdot T - 77,1813,$$

$$b = 0,0098 \cdot T^2 + 0,4021 \cdot T - 18,9111,$$

$$c = -0,0025 \cdot T^2 + 0,1769 \cdot T - 3,0252,$$

$$d = 0,0018 \cdot T^2 - 0,1253 \cdot T + 2,2296.$$

Залежність $pH = pH(B, T)$ показника активної кислотності середовища від щільності чисельності бактерій (B) і від температури (T) відповідно регресійної моделі має наступний вигляд:

$$pH(B) = \exp(a(T) + b(T) \cdot \exp(B)), \quad 7.2$$

де

$$a(T) = -0,0035 \cdot T^2 + 0,2311 \cdot T - 2,3455,$$

$$b(T) = 0,00005 \cdot T^2 - 0,0001 \cdot T + 0,0015/$$

Період зниження кількості життєздатних клітин консорціуму *B.longum* - ЯЗ та *P. shermanii*-4 (31 – 72 години) пов'язаний з наступною фазою культивування – періодом відмирання клітин мікроорганізмів.

Після 31 години культивування розпочинався період зниження приросту біомаси бактерій в залежності від накопичення в середовищі органічних кислот метаболізму мікроорганізмів, що призводить до зміщення реакції середовища до значень pH нижче 5 (табл.4.1).

Залежність $B = B(t, T)$ щільності чисельності клітин бактерій *B.longum* - ЯЗ та *P. shermanii* - 4 від часу (t) і від температури (T) наведена рівнянням 8.1. У цьому випадку для періода загибелі бактерій відповідно до регресійної моделі рівняння зменшення чисельності росту визначається наступним кінетичним рівнянням

$$B = \frac{a}{b+c} \left(c + b e^{-(b+c)t} \right) \quad (8.1)$$

А залежність коефіцієнтів a , b , c від температури (T) мають наступний вигляд (вирішенням задачі квадратичної інтерполяції):

$$a = -1,411 \cdot T^2 + 94,07 \cdot T - 1539,$$

$$b = -0,007622 \cdot T^2 + 0,5064 \cdot T - 8,297,$$

$$c = -0,002355 \cdot T^2 + 0,1504 \cdot T - 2,329.$$

При цьому коефіцієнт детермінації майже 1 ($r^2 = 0,98$).

Кінетичні залежності зменшення чисельності клітин консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій для цього періоду визначаються наступною системою диференціальних рівнянь:

$$B = y_1 + y_2 \quad (8.2)$$

$$\begin{aligned} \frac{dy_1}{dx} &= 0, & y_1 &= \frac{ac}{b+c}, \\ \frac{dy_2}{dx} &= -(b+c)y_2, & y_2 &= \frac{ab}{b+c} e^{-(b+c)x}. \end{aligned}$$

Залежність $pH = pH(B, T)$ показника активної кислотності середовища (pH) від щільності чисельності бактерій (B) і від температури (T) відповідно регресійної моделі має вигляд:

$$pH(B) = \exp(a(T) + b(T) \cdot B) \quad (8.3),$$

де

$$a(T) = 0,0386 \cdot T^2 - 2,428 \cdot T + 37,6,$$

$$b(T) = -0,002083 \cdot T^2 + 0,1187 \cdot T - 1,466.$$

Коефіцієнт детермінації $r^2 = 0,97$.

Після того, як були розглянуті регресійні моделі всіх етапів за часом культивування системи бактерій *B. longum* - ЯЗ та *P. shermanii*-4, була проведена робота над оптимізацією умов культивування.

У якості критеріїв оптимальності було обрано основні показники, які характеризують вихід біомаси в процесі культивування: показники колоніє утворюючих одиниць, показники активної кислотності. Показник колоніє утворюючих одиниць (КУО/см³) характеризує загальну картину виходу біомаси мікроорганізмів в процесі культивування.

Показників 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.

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 визначаються кінетичним рівнянням:

$$B = a + \frac{bc}{d - c} (e^{-ct} - e^{-dt}) \quad (9.1)$$

де $a = 0,09113 \cdot T^2 - 5,942 \cdot T + 95,17$,

$b = -0,4248 \cdot T^2 - 28,31 \cdot T + 456,3$,

$c = 0,003615 \cdot T^2 - 0,2446 \cdot T + 4,25$,

$d = 0,000642 \cdot T^2 - 0,042855 \cdot T + 0,7067$.

Розглянемо графік цієї функції $B = B(t, T)$. Цей графік будуюмо за допомогою програми математичного моделювання MATLAB [188]. Програма дозволила створити трьохмірний графік за допомогою функції `meshgrid` і має вигляд

```
[X,Y]=meshgrid(7.5:0.5:24,30:0.5:37);
a1=0.09113.*Y.^2-5.9424.*Y+95.1682;
b1=-0.4248.*Y.^2+28.3074.*Y-456.3301;
c1=0.003615.*Y.^2-0.2446.*Y+4.2498;
d1=-0.000642.*Y.^2+0.04285.*Y-0.7067;
Z=a1-((b1.*c1)./(c1-d1)).*(exp(-c1.*X)-exp(-d1.*X));
surf(X,Y,Z)
```

Із рис 4.1. видно, що поверхня $B = B(t, T)$ має максимум для деяких значень часу (t) температури (T). Для визначення максимуму функції $B = B(t, T)$ маємо задачу нелінійного програмування, яка вирішується також в системі MATLAB. Відповідна програма оптимізації має вигляд

```

function f=myfun(x)
a1=0.09113*x(2)^2-5.9424*x(2)+95.1682;
b1=-0.4248*x(2)^2+28.3074*x(2)-456.3301;
c1=0.003615*x(2)^2-0.2446*x(2)+4.2498;
d1=-0.000642*x(2)^2+0.04285*x(2)-0.7067;
f=-a1+((b1*c1)/(c1-d1))*(exp(-c1*x(1))-exp(-d1*x(1)));
end

```

```

A=[-1 0;1 0;0 -1;0 1];
b=[7.5;24;30;37];
x0=[7.5;30];
[x,fval]=fmincon('myfun',x0,A,b)

```

```

x =
    24.0000
    33.7440
fval =
    10.7494

```

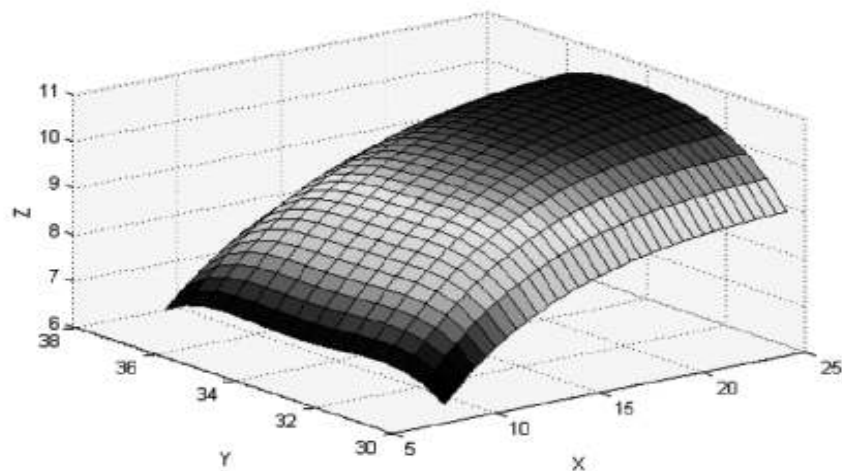


Рис. 4.1. Графік meshgrid-функції: культивування консорціуму *B.longum* - ЯЗ та *P. shermanii*-4: X- час культивування, год; Y - температура культивування, °C; Z – кількість життєздатних клітин, Lg КУО/см³.

Лужно-кислотний показник розчину pH етапу активного розмноження клітин бактерій *B.longum* - ЯЗ та *P. shermanii* - 4 визначається співвідношенням

$$pH = \exp(a(T) + b(T) \cdot B), \quad (9.2)$$

де

$$\begin{aligned} a(T) &= 0.01469 \cdot T^2 - 0.9396 T + 17.33, \\ b(T) &= -0.00272 \cdot T^2 + 0.1781 T - 2.919. \end{aligned}$$

Завдяки методам математичного моделювання, встановлено, що найбільша кількість життєздатних пробіотичних мікроорганізмів сягає 10,75 Lg КУО/см³ із значенням лужно-кислотного показника розчину 5,1881 за наступних оптимальних умов: культивування протягом 24 годин за температури $T = 33,74^\circ\text{C}$.

4.2. Розробка технології виготовлення синбіотичної біологічно активної добавки «Біфіпропіонік™»

На основі науково обґрунтованих експериментальних результатів дослідів та оптимізації ключових параметрів накопичення бактеріальної біомаси була розроблена схема біотехнології виробництва синбіотичних біологічно активних добавок «Біфіпропіонік™» на основі пробіотичних культур *B.longum* - ЯЗ, *P. shermanii* - 4.

Технологічна схема виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонік™», включає наступні етапи:

- підготовка добової культури *Bifidobacterium longum* - ЯЗ та *Propionibacterium shermanii* - 4;
- приготування середовища культивування мікроорганізмів;
- стерилізація середовища культивування мікроорганізмів;
- охолодження середовища культивування мікроорганізмів до температури заквашування;

- внесення інокуляту добової культури *B. longum* - ЯЗ та *P. shermanii* - 4 середовище культивування;
- культивування мікроорганізмів у поживному середовищі;
- відділення симбіотичної біомаси біфідо- та пропіоновокислих бактерій від середовища культивування, шляхом центрифугування;
- додавання до отриманої симбіотичної біомаси мікроорганізмів захисного середовища;
- ліофільне висушування біомаси мікроорганізмів;
- розпушування;
- таблетування;
- фасування і упаковування функціонального харчового інгредієнту;
- транспортування і зберігання функціонального харчового інгредієнту.

Для виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонік[™]», використовують наступну сировину і матеріали:

- вода питна ГОСТ 2874-82;
- пробіотичні культури *B. longum* - ЯЗ, *P. shermanii* - 4;
- пептон ферментативний;
- сирна сироватка;
- пептон ферментативний;
- натрій оцтовокислий;
- калій фосфорнокислий;
- натрій фосфорнокислий;
- аскорбінова кислота;
- соєва сироватка;
- вода;
- молоко;
- желатоза;
- сахароза.

За якісними характеристиками обрані компоненти повинні відповідати вимогам, що пред'являються нормативною документацією [196, 197].

З метою виготовлення синбіотичної біологічно активної добавки «Біфіпропіонік[™]» була розроблена технологічна схема (рис. 4.2).



Рис. 4.2. Технологічна схема виготовлення «Біфідопропіонік[™]»

Технологічний процес виробництва БАД починається з приймання сировини і оцінки його якості, після чого усі етапи процесу виробництва повинні проводитись в умовах, гарантуючих високий санітарно-гігієнічний рівень підприємства. Тому після перевірки якості сировини необхідно провести стерилізацію за для отримання стерильного поживного середовища культивування пробіотичних бактерій. Середовище культивування

стерилізують при 115-120 °С, протягом 20 хвилин з послідуочим охолодженням до 30-35 °С.

Для отримання добової культури зразок сухої біомаси *Bifidobacterium longum* - Я 3 та *Propionibacterium shermanii* - 4 масою 50 мг розводять в 1 мл середовища культивування, далі по 500 мкл розведеної культури засівають в 9,5 мл середовища культивування. Проби протягом 24 годин інкубують в термостаті при оптимальних температурах для біфідо- та пропіоновокислих бактерій 37 °С та 30 °С відповідно. Після одержання культури I генерації проводять мікробіологічний контроль мікроскопіюванням, а також посів на МПА з 5 % глюкози і агаризоване середовище Сабура – за 22 °С протягом 72 год. Якщо сторонньої мікробіоти не виявлено, то культуру I генерації використовують як посівний матеріал для одержання культури II генерації. Збільшуючи об'єм середовища у 10 разів. Через 24 год здійснюють мікробіологічний контроль як описано вище, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха .

Ферментер заповнюють поживним середовищем, а потім одночасно засівають культури II генерації *B. longum* - Я 3 та *P. shermanii* - 4 у співвідношенні 1:1 в рівних об'ємах у кількості 5% від загального об'єму середовища культивування. Процес культивування проводять протягом 24 годин за температури 34 °С. Для відділення біомаси клітин симбіотичного консорціуму проводили центрифугування при 8000 об/хв. протягом 20 хв. Після видалення супернатанту біомасу симбіотичного консорціуму *B.longum* - Я3 та *P. shermanii* - 4 ресуспендують захисним середовищем, яке містить наступні компоненти, % : сахарозу – 50, желатозу – 25, молоко – 25.

Висушування суміші проводиться із попереднім заморожуванням за температури -20 °С протягом 12 годин. Через 8 годин від початку заморозки температуру знижують до -30 °С. Для отримання сухого порошкоподібного продукту із залишком вологи 5%, сублімацію проводять протягом 20-24 годин з подальшим таблетуванням суміші.

Для отримання таблетованої форми використовували гідралівтичну машину таблетування методом прямого фасування із тиском 30 МПа та розігрівом матриці до 45°C [163].

4.5. Розробка технології виготовлення функціонального інгредієнту «БПМ™».

За результатами експериментальної роботи та оптимізації процесів культивування була розроблена біотехнологія отримання функціонального інгредієнту «БПМ™» (рис 4.2)

Для виробництва функціонального інгредієнту «БПМ™» використовували продукти метаболізму пробіотичних культур *B. longum* – ЯЗ, *P. shermanii* – 4. Зазначені штами культивували протягом 24 годин за температури 34 °C на соєво-лактозному середовищі, яке мало наступний вміст (мас. %):

- Пептон – 1,0
- Сирна сироватка – 0,3
- Цитрат натрію – 0,6
- Дигідрофосфат калію – 0,1
- Гідрофосфат натрію – 0,2
- Аскорбінова кислота – 0,05
- Соєва сироватка – 2
- Дистильована вода – 95,75.

Усі компоненти середовища доводили дистильованою водою до об'єму 1000 мл, при цьому значення рН поживного середовища повинно бути нейтрально значення – 7,0. Процес стерилізації проводили за температури 121 °C протягом 20 хвилин з послідовним охолодженням до температури заквашування симбіотичного консорціуму *B. longum* - ЯЗ *P. Shermanii* - 4, а саме, 34 °C. Зазначені штами II генерації вносили в підготовлене середовище одночасно у співвідношення 1:1 в кількості не менше 10^6 КУО/см³ з наступним культивуванням протягом 24 годин за температури 34 °C.

У якості стимулятора росту пробіотичних культур використовували 3% соєвої сироватки, яка є однією із складових поживного середовища культивування. Склад та спосіб приготування поживного середовища наведено у розділі 3.

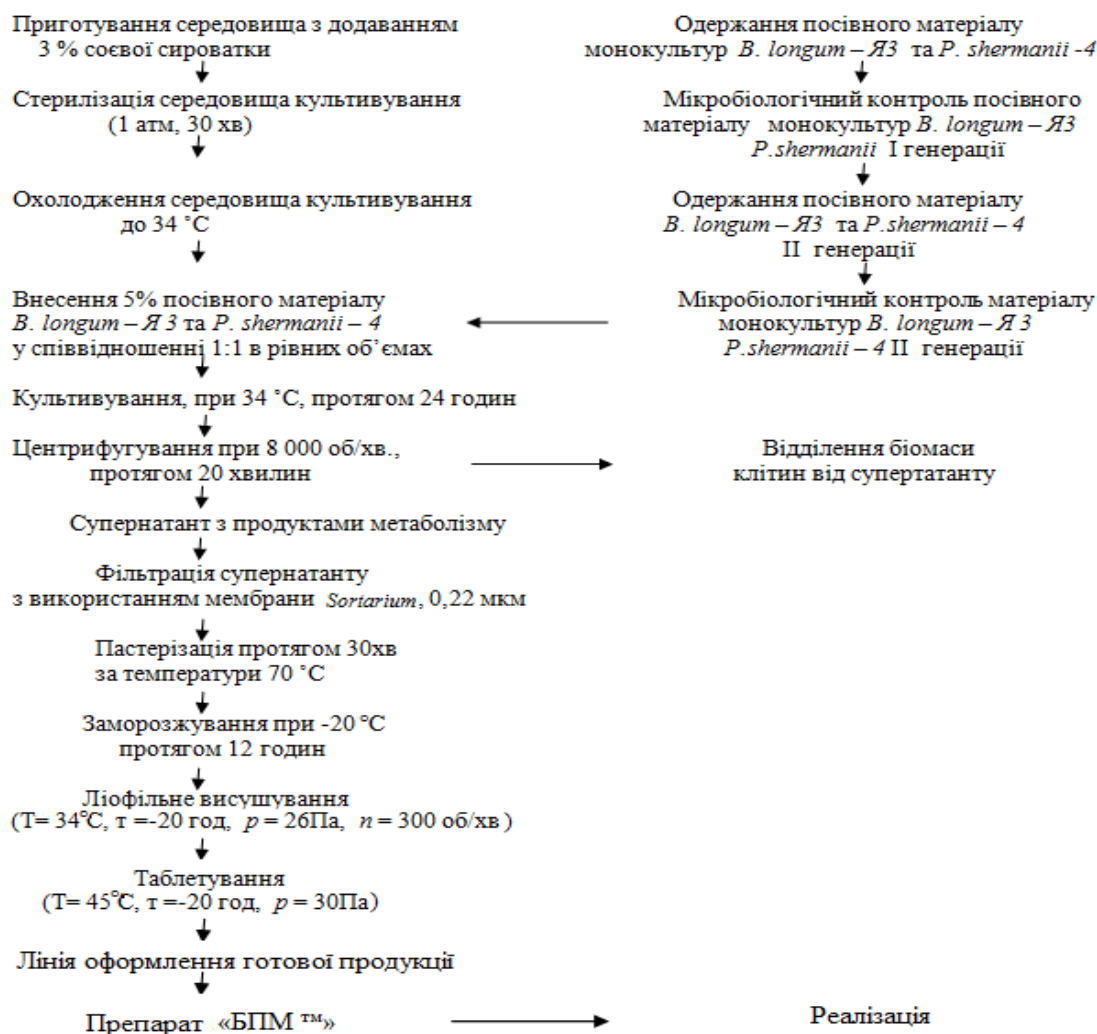


Рис. 4.2. Технологічна схема препарату «БПМ™».

Для відділення культуральної рідини, яка містить продукти метаболізму - екзометаболіти, включаючи 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнову кислоту, від біомаси пробіотичних культур проводили центрифугування при 8000 об/хв. протягом 20 хв з подальшою фільтрацією. Отриманий супернатант із вмістом 19,0...20,1 % сухих речовин, у тому числі 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнова кислота у кількості 0,07 % (4,1 мг/л), пастеризували за температури 70 °C протягом 30 хв.

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

Для отримання таблетованої форми використовували метод прямого фасування із тиском 30МПа та розігрівом матриці до 45°C [164].

4.6. Розробка технології отримання функціонального інгредієнту «Бігестім[™]».

Для виробництва препарату «Бігестім» з урахуванням процесів оптимізації була розроблена технологія виробництва (рис. 4.3).

На початковому етапі готують соєво-лактозне середовище культивування. Для усунення сторонньої мікробіоти проводять стерилізацію поживного середовища за температури 121°C протягом 20 хвилин з послідовним охолодженням до оптимальної температури культивування пропіоновокислих бактерій, а саме 30°C .

Ферментер з перемішуванням заповнюють $2/3$ загального об'єму (100 л) поживним середовищем, а потім засівають культуру II генерації *P. shermanii* - 4 у кількості 5% від загального об'єму середовища культивування.

Для отримання посівного матеріалу, який закладають у ферментер, спочатку необхідно провести низку лабораторних маніпуляцій з метою одержання посівного матеріалу і отримання культури I генерації *P. shermanii* - 4. Після 24 годин інкубації за температури 30°C отриману культуру I генерації піддають мікробіологічному контролю як описано вище у розділі 4.2. Якщо сторонніх мікроорганізмів не виявлено, то культуру I генерації використовують як посівний матеріал для одержання культури II генерації. Збільшуючи об'єм середовища у 10 разів. Через 24 год знов здійснюють

мікробіологічний контроль, та визначають кількість життєздатних клітин за методом Коха.

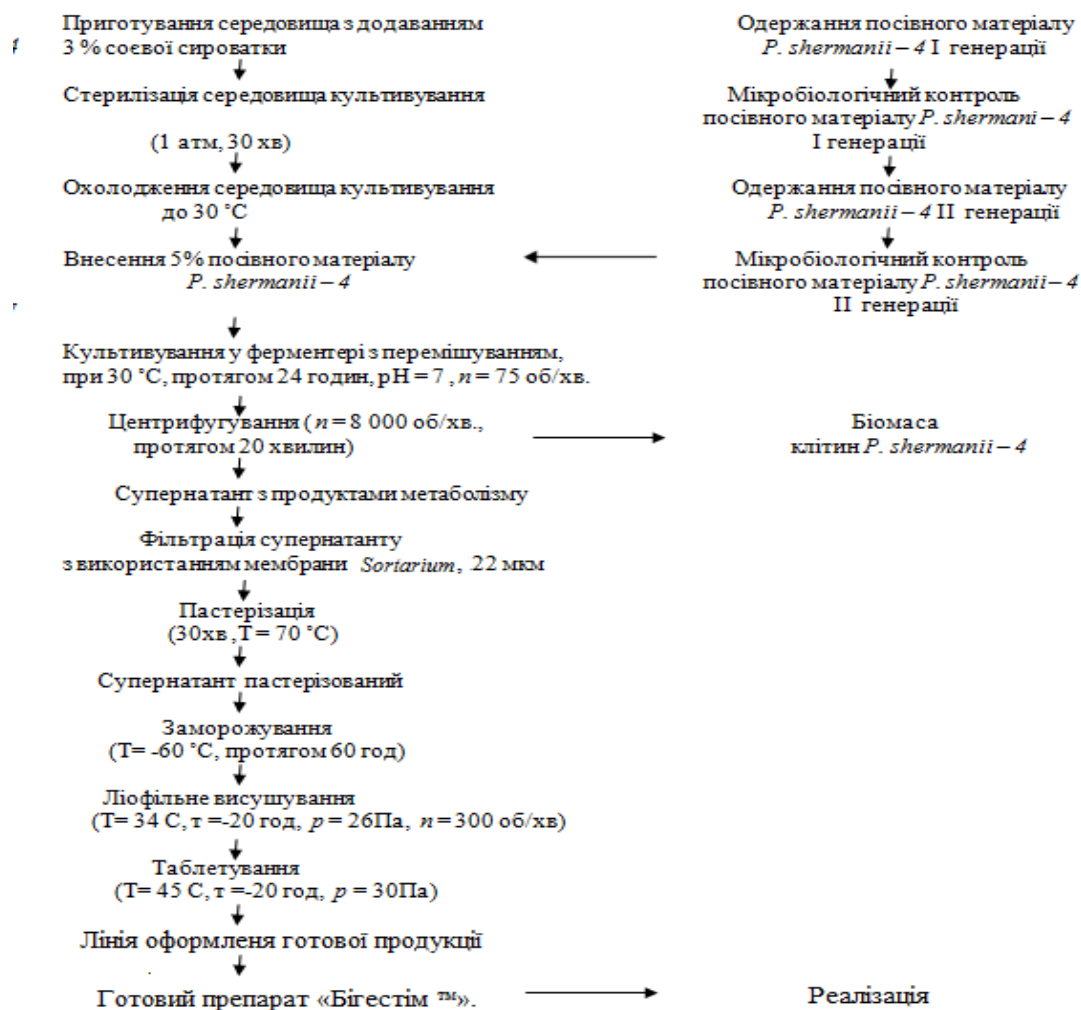


Рис. 4.3. Технологічна схема виготовлення препарату «Бігестім™».

Процес культивування у ферментері з перемішуванням при 75 об/хв проводять протягом 24 годин за температури 30 °C. Для відділення культуральної рідини від біомаси клітин проводили центрифугування при 8000 обертах протягом 20 хвилин, з послідуною фільтрацією в стерильних умовах. Отриманий супернатант із вмістом 19,1...20,3 % сухих речовин, у тому числі 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнова кислота у кількості 0,12 % (6,7 мг/л), пастеризували за температури 70 °C протягом 30 хв.

Висушування суміші проводиться із попереднім заморожуванням за температури -20 °C протягом 12 годин. Через 8 годин від початку заморозки температуру знижують до -30 °C. Для отримання сухого порошкоподібного

продукту із залишком вологи 5%, сублімацію проводять протягом 20-24 годин з подальшим таблетуванням суміші.

Для отримання таблетованої форми використовували метод прямого фасування із тиском 30 МПа та розігрівом матриці до 45°C [163-165].

4.5. Промислова апробація технології отримання синбіотичних біологічно активних добавок

Промислову апробацію розробленої технології виробництва синбіотичних біологічно активних добавок проводили на базі ООО НПО «Аріадна» в м.Одесі (Додаток Б, В, Г). В ході промислової апробації була виготовлена дослідна партія по 1000 г наступних функціональних інгредієнтів, які отримали такі торгові назви: «Біфідопропіонік™» (на основі пробіотичних культур), «БПМ™» (на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму *Bifidobacterium longum* - ЯЗ *Propionibacterium shermani* - 4.), «Бігестім™» (на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму пробіотичної культури *Propionibacterium shermani* - 4.).

Мікробіологічний аналіз відіграє важливу роль в оцінці якості харчових продуктів пробіотичного призначення і препаратів пробіотиків та здійснюється за низкою вимог. Ці вимоги включають в себе гігієнічні нормативи і за мікробіологічні показники. При оцінці якості функціональних харчових інгредієнтів досліджується розвиток наступних груп мікроорганізмів: санітарно-показові, до яких відносяться мезофільні аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми (МАФАМ), бактерії групи кишкових паличок БГКП (коліформи), бактерії роду *Enterobacteriaceae*, ентерококи; умовно-патогенні мікроорганізми, до яких відносяться *E. coli*, *S. aureus*, бактерії роду *Proteus*, *B. cereus* і сульфітредукуючих клостридії; патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели; мікроорганізми псування дріжджі і плісняві гриби, молочнокислі мікроорганізми; мікроорганізми заквасок мікрофлори і пробіотичні мікроорганізми (молочнокислі

мікроорганізми, пропіоновокислі мікроорганізми, дріжджі, біфідобактерії, ацидофільні бактерії і ін.) в продуктах з нормованим рівнем біотехнологічної мікрофлори і в пробіотичних продуктах (таблиця 4.2).

Таблиця 4.2

Мікробіологічні показники готового препарату в нормі

Назва показників	Норма
МАФАнМ	$5 \cdot 10^3$
Плісняві гриби, КУО в 1г продукту	не допускається
патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г продукту	не допускається
БГКП	не допускається

Виготовлені препарати («Біфідопропіонік[™]», «БМП[™]», «Бігістім[™]») зберігали при температурі від 2 °С до 8 °С протягом 18 місяців. За цей термін зберігання проводили контроль мікробіологічних, органолептичних та фізико-хімічних показників якості. Препарат характеризувався порошкоподібною консистенцією бежевого кольору із специфічним смаком та запахом

Для запобігання мікробного забруднення сторонньою мікробіотою з навколишнього середовищі мікробіологічний контроль досліджувальних зразків проводили за правилами асептики. Посіви проводили згідно чашкового методу на щільні поживні середовища. Мікробіологічні показники препарату «Біфідопропіонік[™]» наведені у таблиці 4.3

Таблиця 4.3

Мікробіологічні показники препарату «Біфідопропіонік[™]»

Назва показників	Вміст у препараті
1	2
МАФАнМ	$1 \cdot 10^2$

1	2
Плісняві гриби, КУО в 1г продукту	не виявлено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г продукту	не виявлено
БГКП	не виявлено

Результати досліджень підтверджують, що зразки, які досліджувались відповідають вимогам мікробіологічних показників готового препарату в процесі зберігання. Встановлено, що патогенні мікроорганізми, бактерії групи кишкової палочки та плісняві гриби були відсутні.

Оскільки функціональний інгредієнт «Біфідопропіонік™» створений на основі живих пробіотичних клітин, а ефективність такого препарату залежить від кількості живих мікроорганізмів, здатних здійснювати пробіотичні ефекти на мікробіоту ШКТ людини, було доцільним провести дослідження зміни кількості життєздатних пробіотичних мікроорганізмів в процесі зберігання. «Біфідопропіонік™» зберігали в морозильній камері (при температурі -18..-12 °С) та в холодильній камері (при температурі +2..+6 °С) протягом 18 місяців.

Зважаючи на те, що заявлений нами препарат є симбіотичним консорціумом, стало цікавим порівняти його термін зберігання з терміном зберігання бактеріальної моноштамової закваски, а саме з відомимою пробіотичною культурою *B. bifidum* - 1. Відбір зразків проводили щомісяця в стерильних умовах.

За результатами досліджень, які наведені у таблиці 4.4., слід відмітити, що термін зберігання пробіотичних мікроорганізмів більш тривалий за умов зберігання в морозильній камері. При зберігання в холодильній камері в продовж 12 місяців відбувалось зниження кількості життєздатних клітин на один порядок, а в продовж 18 місяців - на 2 порядки, в той час як при зберігання за температури -18..-12 °С зниження відбувалось з плином 18

місяців тільки на один порядок. Ця закономірність характерна, як для зразку, який досліджували, так і для контрольного. Так кількість життєздатних клітин «Біфідопропіонік™» в умовах зберігання холодильної камери залишалась у межах 10^{10} КУО/см³ впродовж 7 місяців, а в умовах морозильної камери – 10^{10} КУО/см³ протягом 11 місяців. В процесі подальшого терміну зберігання за температурного режиму +2..+6 °С показники кількості життєздатних клітин поступово знижувалися і вже наприкінці 12 місяця сягали $3 \cdot 10^9$ КУО/см³, а наприкінці 18 місяця кількість клітин становила $1,8 \cdot 10^8$ КУО/см³. Однак навіть найнижчі експериментальні показники колонієутворюючих клітин забезпечували пробіотичну дозу.

Також слід відзначити, що на термін зберігання залежить не тільки від температурного режиму утримання препарату, а й від того в яких зв'язках знаходяться пробіотичні мікроорганізми. Так мікроорганізми у складі «Біфідопропіоні™», які знаходились у симбіотичних зв'язках, мали більш високу кількість життєздатних клітин в процесі зберігання, ніж клітини у контрольному зразку.

Це можна пояснити тим, що пропіоновокислі бактерії здатні синтезувати екзополісахариди, які забезпечують гнучку адаптацію бактерій і захищають від несприятливих факторів зовнішнього середовища (зміна температури, низькі значення рН, заморожування та дегідратація) як популяцію власних клітин, так і клітин бактерій, з якими вступають в симбіотичний консорціум. Екзополісахариди також захищають клітини від фагоцитів, амебної інфекції та фагів, запобігають денатурації білків [198.].

З врахуванням вищезазначених даних, рекомендовано зберігати «Біфідопропіонік™» в холодильнику (за температури +2 .. + 6 °С) - 12 місяців, а в морозильній камері (при температурі -18 ..- 12 °С) - 18 місяців.

У якості пребіотичного компонента для створення синбіотичного продукту використовували синтезовані пропіоновокислими бактеріями екзометаболіти, а саме 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнова кислота, яка за попередніми експериментальними даними характеризується вираженими

антагоністичними, бактеріостатичними та бактеріоцидними властивостями [169].

Таблиця 4.4

Характеристика препарату «Біфідопропіонік™» в процесі зберігання

Термін зберігання, міс	«Біфідопропіонік™»		Контроль	
	+2..+6	-18..-12	+2..+6	-18..-12
	Кількість життєздатних клітин, КУО/см ³ .			
1	$7 \cdot 10^{10}$	$7 \cdot 10^{10}$	$2,2 \cdot 10^9$	$2,2 \cdot 10^9$
2	$7 \cdot 10^{10}$	$7 \cdot 10^{10}$	$2,1 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$
3	$7 \cdot 10^{10}$	$7 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^9$
4	$6,9 \cdot 10^{10}$	$7 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^9$
5	$5 \cdot 10^{10}$	$6,9 \cdot 10^{10}$	$9,1 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^9$
6	$4 \cdot 10^{10}$	$5,3 \cdot 10^{10}$	$6,3 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^9$
7	$2 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$	$4,6 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^9$
8	$9 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^{10}$	$3,8 \cdot 10^8$	$9,8 \cdot 10^8$
9	$9 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^{10}$	$3,8 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^8$
10	$7 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^{10}$	$3,1 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^8$
11	$5 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^{10}$	$2,8 \cdot 10^8$	$8,5 \cdot 10^8$
12	$3 \cdot 10^9$	$9,0 \cdot 10^9$	$2,8 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^8$
13	$8,5 \cdot 10^8$	$8,6 \cdot 10^9$	$2,2 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^8$
14	$7 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^8$
15	$5 \cdot 10^8$	$6,2 \cdot 10^9$	$9,1 \cdot 10^{10}$	$7,5 \cdot 10^8$
16	$4 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^9$	$8,9 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^8$
17	$3 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^9$	$7,4 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^8$
18	$1,8 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^9$	$7,2 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^8$

Кількісний вміст 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти в культуральній рідині консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій становить 4,1 мг/л. Протягом терміну зберігання від одного до вісімнадцяти місяців відмічено

незначні коливання вмісту 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти у складі препарату «Біфідопропіонік TM» (таб. 4.5.).

Таблиця 4.5

**Вміст 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти в препаратах
в процесі зберігання**

Назва препарату	Тривалість зберігання								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Кількісний вміст 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти мг/л								
«Біфідопропіонік TM »	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,09
	4,09	4,09	4,08	4,08	4,06	4,06	4,05	4,05	4,05
«БПМ TM »	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
	4,1	4,09	4,09	4,07	4,07	4,05	4,05	4,04	4,04
«Бігестім TM »	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,69	6,69	6,69	6,67
	6,67	6,67	6,67	6,66	6,65	6,63	6,63	6,61	6,6

Препарат «БПМ TM» на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму пробіотичних культур *Bifidobacterium longum* - ЯЗ *Propionibacterium shermani* - 4 мав порошкову консистенцію бежевого кольору зі специфічним запахом. Мікробіологічні показники підтверджують відсутність сторонньої мікробіоти в отриманному продукті (таб 4.6).

Препарат відповідає усім санітарно-мікробіологічним нормам.

В процесі зберігання кількісний вміст 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнової кислоти у складі препарату «БПМ TM» зберігався на рівні 4,1 мг/л (таб. 4.5.).

Метаболітний препарат «Бігестім TM» на основі культуральної рідини, що містить метаболіти *Propionibacterium shermani* – 4 мав порошкову консистенцію бежевого кольору зі специфічним запахом.

Таблиця 4.6.

Мікробіологічні показники препарату «БПМ™»

Назва показників	Вміст у препараті
МАФАнМ	$1 \cdot 10^2$
Плісняві гриби, КУО в 1г продукту	не виявлено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г продукту	не виявлено
БГКП	не виявлено
Пробіотичні мікроорганізми	не виявлено

В процесі зберігання протягом 18 місяців проводили дослідження мікробіологічних показників препарату. Результати досліджень наведені у таблиці 4.7.

Таблиця 4.7.

Мікробіологічні показники препарату «Бігестім™»

Назва показників	Вміст у препараті
МАФАнМ	$1 \cdot 10^2$
Плісняві гриби, КУО в 1г продукту	не виявлено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г продукту	не виявлено
БГКП	не виявлено
P. shermani - 4	не виявлено

За мікробіологічними показниками бактерії групи кишкової палички, санітарно показові мікроорганізми, плісняві гриби не були виявлені. Продуцент 1,4-дігііроксі-2-нафтоїнової кислоти, *Propionibacterium shermani* - 4, також був відсутній, а сам пребіотичний компонент в процесі зберігання зазнавав незначного коливання від 6,7 мг/л до 6,7 мг/л (таб. 4.5).

1,4-дігідроксі-2-нафтоїнова кислота виявилась стійкою речовиною з вираженими пребіотичними властивостями – в процесі зберігання кількісний вміст якої у препаратах «Біфідопропіонік[™]», «БМП[™]» був на рівні 4,1 мг/л, а в препараті «Бігістім[™]» – 6,7 мг/л.

4.6. Медико-біологічні дослідження

Контроль безпеки препаратів «Біфідопропіонік[™]», «БПМ[™]», «Бігестім[™]» проводили протягом 30 діб на базі лабораторії Одеського національного університету імені І. І. Мечникова на безпорідних білих мишах. Протягом перших 7 діб лабораторних тварин годували стандартним раціоном віварію без додавання біологічно активних добавок. Від початку 8 доби експерименту всіх піддослідних тварин було розділено на 5 груп (по 10 голів у групі), відповідно до схеми експерименту, розробленої кафедрою біохімії, мікробіології і фізіології харчування Одеської національної академії харчових технологій (ОНАХТ). Контрольні групи підтримували на стандартному збалансованому раціоні віварію. Дослідні групи також знаходилися на стандартному раціоні харчування зі щоденним включенням синбіотичних БАД, які були розроблені нами. Протягом експерименту через кожні 10 діб відбирали проби фікалій тварин контрольної групи і дослідної групи, які піддавали мікробіологічному аналізу в лабораторії мікробіології кафедри біохімії, мікробіології і фізіології харчування ОНАХТ.

Протягом 30-добового прийому першою групою тварин синбіотичного препарату «Біфідопропіонік[™]», другою дослідною групою тварин – препарату «БПМ[™]»; третьою дослідною групою тварин – препарат «Бігестім[™]», загальний стан тварин залишався без змін, порівняно із контролем: миші добре поїдали корм, поведінка тварин була активною, рухливість не змінювалась.

Шерстяний покрив тварин був сухим, блискучим, видимі слизові – блідо-рожеві. В ході експерименту не було виявлено статистичного значущих

змін маси тіла щурів дослідної групи у порівнянні із 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.

4.7. Розрахунок економічної ефективності синбіотичних біологічно активних добавок

Протягом останніх десяти років поширення біологічно активних добавок (БАД) на ринку України сформувався досить високий інтерес до цієї продукції, як з боку виробників, так і споживачів.

Офіційно в Україні БАД класифікують на три групи: нутрицевтики, еубіотики і парафармацевтики.

Еубіотики - бактеріальні препарати, які регулюють діяльність мікробіоти шлунково-кишкового тракту.

Нутрицевтики - це біодобавки, концентрати біологічно активних речовин (БАР), які збагачують раціон харчування людини окремими речовинами, або комплексами, щоб рівень їх вмісту в раціоні відповідав фізіологічній потреби людини. До нутрицевтикам відносять вітаміни, мінеральні речовини, амінокислоти, харчові волокна, джерела поліненасичених жирних кислот.

Парафармацевтики є класом біодобавок, які за зовнішнім виглядом і дією схожі з лікарськими препаратами (таблетками, капсулами, настоянками і ін.). Парафармацевтики мають загальнооздоровчі, загальнозміцнюючі властивості, можуть застосовуватися з метою профілактики і в комплексному лікуванні хвороб.

В результаті проведених експериментальних досліджень були розроблені технологічні схеми синбіотичних біологічно активних добавок, а також отримання безклитинної форми пробіотика на основі продуктів метаболізму пробіотичних культур, вплив яких направлено на поліпшення стану мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини.

Після аналізу ринка БАД, можна зробити висновок, про те, що розроблені нами продукти будуть затребувані на ринку. Тому доцільним є розрахувати ефективність впровадження результатів наукового дослідження у виробництво.

Мета проекту полягає в організації виробництва перспективних біологічно активних добавок, що володіють позитивним впливом на макроекологічний стан організму.

Повний розрахунок собівартості розроблених препаратів приведено в таблицях 4.7, 4.8.

Таблиця 4.7.

Калькуляція собівартості БАД «Біфіпропіонік™»

Назва сировини	Одиниця виміру	Кількість одиниць в 1 кг	В місяць 460 л (2,3кг)	Ціна Одиниці, кг/грн	Вартість продукту, грн
1	2	3	4	5	6
Сирна сироватка	л	200,0	460	7,50	1125
Пептон ферментативний	кг	2,0	46	147,0	639,4
Натрій оцтовокислий	кг	1,2	2,76	113,85	676,2
Калій фосфорнокислий	кг	0,4	0,92	78,0	314,2
Натрій фосфорнокислий	кг	0,1	0,23	33,0	7,59
Аскорбінова кислота	кг	0,01	0,023	1716,25	39,5
Соева сироватка	л	6,0	13,8	945,0	13041
Вода	л	200,0	460	0,8	368
Склад захисного середовища					
Молоко	л	0,375	0,86	14,34	12,3
Желатин	кг	0,375	0,86	239,3	205,8
Цукор	кг	0,250	0,58	13,49	7,8

1	2	3	4	5	6
Вода	л	0,3	0,69	0,8	0,55
Всього					16509,1
Миючий засіб	кг	0,2	80	14	1120
Дезинфікуючий засіб	кг	0,2	80	128	10240
Пластикові флакони	шт	10	4000	1,4	4800
Коробки картонові для фасування	шт	10	4000	0,2	800
Етикетки	шт	10	4400	0,4	1600
Коробки картонові	шт	2	80	4,5	360
Всього			0,8		18920
Енергоресурси					3910
Заробітна плата виробничих робітників					30000
Відрахування від з/п				37,58	9770,8
Амортизація обладнання					2071,6
Втрати від браку				0,4 %	631,64
Інші виробничі витрати				5 %	10960,72
Виробнича собівартість					92773.86
Комерційні витрати				18%	7284
% по банківському кредиту				25%	17280,7
Повна собівартість					118338.56
Вартість 1 флакону (0,6г)					30,87
Рентабельність 15%					5,21
Ціна					36,08
Ціна з НДС					50,73

Прибуток за рік = $(36,08 - 30,87) \cdot 12 \cdot 2448 = 183012,48$ грн.

Таблиця 4.7.

**Вартість сировини і основних матеріалів для отримання
«БПМ™» та «Бігестім™»**

Назва сировини	Одиниця виміру	Кількість одиниць в 1 кг	В місяць 460 л (2,3кг)	Ціна Одиниці, кг/грн	Вартість продукту, грн
1	2	3	4	5	6
Супернатант	л	200,0	460	0	0
Молоко	л	0,375	0,86	14,34	12,3
Желатин	кг	0,375	0,86	239,3	205,8
Цукор	кг	0,250	0,58	13,49	7,8
Вода	л	0,3	0,69	0,8	0,55
Всього					226,45
Миючий засіб	кг	0,2	80	14	1120
Дезинфікуючий засіб	кг	0,2	80	128	10240
Пластикові флакони	шт	10	4000	1,4	4800
Коробки картонові для фасування	шт	10	4000	0,2	800
Етикетки	шт	10	4400	0,4	1600
Коробки картонові	шт	2	80	4,5	360
Всього			0,8		18920
Енергоресурси					21210
Заробітна плата виробничих робітників					30000
Відрахування від з/п				37,58	9770,8
Амортизація обладнання					1704,9
Амортизація НМА					266,7

1	2	3	4	5	6
Втрати від браку				0,4 %	631,64
Інші виробничі витрати				5 %	10150,27
Виробнича собівартість					65880,76
Комерційні витрати				18%	7284
% по банківському кредиту				25%	17280,7
Повна собівартість					118338.56
Вартість 1 флакону (0,6г)					10,87
Рентабельність 15%					5,21
Ціна					16,08
Ціна з НДС					30,73

Прибуток за рік = $(16,08 - 10,87) \cdot 12 \cdot 2448 = 183012,48$ грн

Всього прибуток: $183012,48 + 183012,48 + 183012,48 = 549037,44$ грн.

Чистий прибуток $549037,44 - 549037,44 \cdot 0,23 = 296480,22$ грн.

23 % – ставка податку на прибуток

Строк окупності проекту = $\frac{642021,3}{296480,22} = 2,2 \approx 2$ роки 2 місяці

Підприємство працює в одну зміну 5 робочий днів в тиждень. Число робітників, які обслуговують обладнання складає 8 чоловік в зміну. Всього 13 чоловік. Продуктивність обладнання дозволяє отримати 20 літрів заявлених препаратів.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

На основі науково обгрунтованих експериментальних досліджень та математичного моделювання було встановлено раціональні умови сумісного культивування біфідо- та пропіоновокислих бактерій. Найбільший вихід біомаси консорциуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій набував $7 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, (з них *B. longum* - ЯЗ– $4 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ *P. shermani* - $4 - 3 \cdot 10^{10}$ КУО/см³) за одночасного внесення бактеріальних інокулятів у співвідношенні 1:1 з наступним культивуванням на соєво-лактозному середовищі протягом 24 годин за температури 34 °С.

З врахуванням результатів експериментальних даних, рекомендовано зберігати «Біфідопропіонік™» 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™» місими́стить 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти залишався на рівні 4,1мг/л, 4,1мг/л та 6,7мг/л відповідно.

Розроблено технологічні схеми отримання синбіотика та безклітинних пробіотиків.

Розроблено нормативну документацію з отримання 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 shermani* - 4; «Бігестім™» (ТУ У 24.14-02071062-003:2017 та ТІ) – на основі культуральної рідини, що містить продукти метаболізму пробіотичної культури *Propionibacterium shermani* - 4).

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

Проведено медико-біологічні дослідження функціональних інгредієнтів. Встановлено, що отримані препарати володіють високими пробіотичними та антиоксидантними властивостями і не викликають негативного впливу на стан здоров'я дослідних мишей

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

162. Компьютерное моделирование физических и технологических процессов: теория, алгоритмы, программы / Кирилов В.Х. та ін. // Одесса: Изд. ВМВ, 2016. 495с

163. 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.

164. Крупицька Л.О., Капрельянц Л.В., Труфкаті 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. Одесса, 2018. С. 66-68.

165. 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. Одесса, 2017. С. 76-78.

ЗАГАЛЬНІ 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 консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій склало 10^{10} КУО/см³ 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 пребіотики 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 допомогою 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 синбіотику 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/см³ *P. shermanii* - 4 – $3 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, 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 пробіотики зберігати в холодильнику (за температури +2 .. + 6 °C) – 12 місяців, а в морозильній камері (при

температурі -18 ..- 12 °С) - 18 місяців. Протягом всього строку зберігання препаратів «Біфідопропіонік™» «БПМ™», «Бігестім™» 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.

ДОДАТКИ

Додаток А

Комітет по сільському господарству харчової і переробної
промисловості

ДКПП
«УЗГОДЖЕНО»

Перший замісник Головного
державного
Санітарного лікаря України
Висновок санітарно-гігієнічної
експертизи МОЗ України
Від _____ № _____

УКІД
«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проектор з наукової роботи
Одеської національної академії
харчових технологій
Новарова Н. М.



2017р.

Функціональний харчовий інгредієнт

«Біфідопропіонік™»

Технічні умови
(проект)

ТУ У 24.14-02071062-001:2017

Вводиться вперше

Строк введення з «__» _____ 2017р.

Строк дії до «__» _____ 2017р.

РОЗРОБЛЕНО:

Одеської національної академії
харчових технологій
Зав. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ
д.т.н., професор

Л. В. Капрелянц
«__» _____ 2017р.

Асп. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ

Л. О. Крупицька
«__» _____ 2017р.

Одеса,
2017р

1. СФЕРА ВИКОРИСТАННЯ

Представлені технічні умови (далі ТУ) розповсюджуються на функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік™», котрий включає симбіотичні культури *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4, отриманий біотехнологічним методом.

Область використання – для вживання в якості лікувально-профілактичних біологічно активних добавок широкого спектру дії для профілактики дисбактеріозів шлунково-кишкового тракту.

Представлені технічні умови являються власністю Л. В. Капрельянца та Л. О. Крупицької і не можуть бути використані інакше, як зі згодою з ними. Передача, тиражування і використання представлених технічних умов без офіційної згоди Л.В. Капрельянца та Л. О. Крупицької заборонено.

ТУ необхідно регулярно перевіряти, але не менше ніж одного разу в п'ять років після їх введення чи останньої перевірки, якщо не виникає потреба перевірити їх раніше у випадку прийняття нормативно-правових актів, відповідних державних (міждержавних) стандартів та інших нормативних документів, котрі регламентують інші вимоги, ніж ті, що були встановлені в цих ТУ.

Приклад позначення продукції при ідентифікації: «Функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік™».

2. НОРМАТИВНІ ССИЛКИ

В представлених технічних умовах представлені силки на наступні нормативно-технічні документи.

ГОСТ 12.1.005-88	Загальні санітарно-технічні вимоги до повітря в робочій зоні.
ГОСТ 10444-12-88	Харчові продукти. Методи визначення дріжджів і пліснявих грибів.
ГОСТ 10444.15-94	Харчові продукти. Методи визначення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів.
ГОСТ 13586	Визначення органолептичних показників.
ГОСТ 13586.5-85	Визначення масової долі вологи.
ГОСТ 15113.2-77	Визначення домішок
ГОСТ 20996.1-2014	Селен технічний. Методи визначення селену.
ГОСТ 7933-89	Коробковий картон. Технічні умови.
ГОСТ 17768-90	Маркування вантажів
ГОСТ 18251-87	Стрічка клейка на паперовій основі. Технічні умови.
ГОСТ 25951-88	Плівка поліетиленова термостійка. Технічні умови
ГОСТ 26927-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення ртуті.
ГОСТ 26929-93	Сировина і продукти харчові. Підготовка проб. Мінералізація для визначення токсичних елементів.
ГОСТ 26930-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення миш'яка.
ГОСТ 26931-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення

	міді.
ГОСТ 26932-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення свинцю.
ГОСТ 26933-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення кадмію.
ГОСТ 26934-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення цинку.
ГОСТ 27668-88	Підготовка проб до аналізів.
ГОСТ 12.1.012-90	ССБТ. Вібраційна безпека. Загальні вимоги.
ГОСТ 12.1.003-83	ССБТ. Шум. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.1.050-86	ССБТ. Методи виміру шуму на робочих місцях.
ГОСТ 12.3.003-91	ССБТ. Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.3.002-75	ССБТ. Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.4.011-89	ССБТ. Засоби захисту працівників. Загальні вимоги і класифікація.
ГОСТ 3.3.6.142-99	Державні санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.
ГОСТ 201-97	Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць від забруднених хімічними та біологічними речовинами.
СНиП 2.04.05-91	Опалення, вентиляція і кондиціонування.
СНиП 2.04.05-87	Адміністративні і побутове приміщення.
СНиП 11-4-79	Природне та штучне освітлення.
СанПиН 42-123-4240-86	Допустимі кількості міграції (ДКМ) хімічних речовин, які виділяються із полімерних та інших матеріалів, що контактують із харчовими

	продуктами.
СанПиН 42-128-4690-88	Санітарні правила і норми по охороні ґрунту від забруднення побутовими і промисловими відходами.
СанПиН 4630-88	Санітарні правила і норми з охорони навколишнього середовища.
СанПиН 4946-89	Санітарні норми і правила з охорони поверхні вод від забруднення.
МР Мінздраву № 2273-80	Методичні рекомендації з визначення, ідентифікації афлотоксинів в харчових продуктах.
МБТ № 5061-89	Медико-біологічні вимоги і санітарні норми якості продовольчої сировини харчової продукції.
Наказ № 246 від 21.05.2007 р.	Положення про медичний огляд працівників певних категорій.
ОСТ 64-7-382-84	Аркуш-вкладиш. Технічні умови.

3. ТЕХНІЧНІ УМОВИ

3.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік[™]», повинен виготовлятися відповідно до вимог представлених технічних умов, за технологічною інструкцією і правилами для виробництв харчової промисловості, затверджених в установленому порядку.

3.2. За органолептичними показниками функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік™», отриманий біотехнологічним методом, повинен відповідати вимогам, вказаним в таблиці 1.

Таблиця 1

Органолептичні показники

Назва показників	Норма
Зовнішній вигляд	Кристалічний порошок
Смак і запах	Солодкуватий, без запаху
Колір	Світло-коричневий

3.3. За фізико-хімічними показниками функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік™», повинен відповідати вимогам вказаним в таблиці 2.

Таблиця 2

Фізико-хімічні показники

Назва показників	Норма
Сторонні домішки	Не допускаються
Масова частка вологи, % не більше	7,5

3.4. За мікробіологічними показниками функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік™», повинен відповідати вимогам, вказаним в таблиці 3.

Таблиця 3.

Мікробіологічні показники

Назва показників	Норма
КМАФАнМ, КУО в 1 г продукту, не більше	$2,5 \times 10^3$
Плісневі гриби, КУО в 1 г продукту	Не допускаються
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г продукту	Не допускаються
БГКП в 0,1 г продукту	Не допускаються

3.5. Функцірнальний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік™», повинен зберігатися при температурі 4-6° С не більше 12 місяців.

3.6. Вміст токсичних елементів в функціональному харчовому інгредієнті «Біфідопропіонік™», не повинен перевищувати допустимі рівні (табл.4), встановлені «Медико-біологічними вимогами і санітарними нормами якістю продовольчої сировини і харчових продуктів» № 5061-89, встановленими Мінздравом 01.08.89 р.

Таблиця 4

Назва показника	Допустимі рівні (мг/кг), не більше
Токсичні елементи:	
Свинець	не більше 1,0
Кадмій	не більше 0,1
Ртуть	не більше 0,02
Миш'як	не більше 0,2
Мідь	не більше 20,0

3.7. Для виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонік[™]», використовують наступну сировину і матеріали:

- вода питна ГОСТ 2874-82;
- пробіотичні культури *B.longum*-ЯЗ, *P. shermanii*-4;
- пептон ферментативний;
- сирна сироватка;
- пептон ферментативний;
- натрій оцтовокислий;
- калій фосфорнокислий;
- натрій фосфорнокислий;
- аскорбінова кислота;
- соєва сироватка;
- вода;
- молоко;
- желатоза;
- сахароза.

При виробництві функціонального харчового інгредієнта «Біфідопропіонік[™]», сировина повинна відповідати вимогам МБТ і СН № 5061, затвердженим 01.08.1999 р., за мікробіологічними показниками і допустимому вмісту токсичних елементів.

3.8. Функціональний харчовий інгредієнт «Біфіпропіонік[™]» запаковують по 0,4 г в ПЕТ флакони ГОСТ 25951. Відхилення від встановленої маси в одиниці упаковки не повинно перевищувати $\pm 1\%$.

3.9. Маркування кожної пакувальної одиниці проводиться відповідно до ГОСТ 17768-90 з нанесенням наступних позначок:

- товарного знаку, назви, місцезнаходження підприємства-виготовника;
- дати виготовлення;
- маси нетто;
- номеру партії;
- номеру серії;
- термін придатності;
- позначення представлених технічних умов.

4. ВИМОГИ ДО БЕЗПЕКИ, ВИМОГИ ОХОРОНИ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА, УТИЛІЗАЦІЯ

4.1. Технологічний процес виготовлення, функціонального харчового інгредієнту «Біфіпропіонік[™]» в відповідності із ГОСТ 12.3.002-75 «Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.

4.2. Температура зовнішньої поверхні приладів не повинна перевищувати 45° С.

4.3. Освітлення у виробничих приміщеннях повинно відповідати СНиП II-2.

4.4. Мікроклімат виробничих приміщень повинен відповідати ДСН 3.3.6.042.

4.5. Виробничі приміщення обладнують вентиляцією згідно СНиП 2.04.05.

4.6. Еквівалентний рівень шуму (шумове навантаження на робочих місцях) не повинен перевищувати 80 дБа згідно ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.003.

4.7. Еквівалентний коректований рівень загальної вібрації на робочих місцях не повинен перевищувати 92 дБ згідно ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.012.

4.8. Робітники забезпечують спецодягом, згідно галузевим нормам і санітарно- побутовим приміщенням згідно СНиП 2.09.04.

4.9. Робітники проходять періодичні медогляди згідно наказу МЗ № 45 від 31.03.94.

4.10. Контроль повітря робочої зони проводиться згідно ГОСТ 12.1.050., мікроклімату по ДСН 3.3.6.042.

4.11. Контроль рівня шуму проводиться по ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.050, вібрації по ГОСТ 12.1.012, ДСН 3.3.6.039.

4.12. Контроль стану навколишнього середовища, який включає охорону атмосферного повітря, контроль скиди стічних вод, охорону ґрунту, повинен проводитись відповідно із вимогами:

- атмосфера ДСП 201;
- поверхневі води СанПиН 4630;
- території населених пунктів СанПиН 42-128-4690.

4.13. Утилізація відходів виробництва у відповідності із санітарними нормами ВОЗ України.

5. ПРАВИЛА ПРИЙМАННЯ

5.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Біфіпропіонік TM» повинен прийматись партіями. Партією вважається кількість продукту, котра випускається за добу.

5.2. Приймально-здавальними партіями піддається кожна партія функціонального харчового інгредієнту «Біфіпропіонік TM» за органолептичними показниками, стану упаковки і маркування. Об'єм виробництва визначається за ГОСТ13586.3-83.

5.3. Фізико-хімічні показники є гарантійними і визначаються періодично не рідше ніж 1раз в один місяць аналітичними методами і за вимогами контролюючої організації.

5.4. Показники допустимої норми токсичних елементів, а також мікробіологічні показники визначають не рідше 1 разу в шість місяців, а також за вимогами органів державної і відомчої санітарної служби при наявності до цього відповідних показників.

5.5. Кожна партія продукту, що випускається повинна бути перевірена відділом технічного контролю (лабораторією) підприємства на відповідність вимогам справжнього стандарту і бути оформленою посвідченням по якості.

5.6. Оригінал посвідчення про якість зберігається в експедиції підприємства-виробника, а в документі, що супроводжує продукцію зі складу на реалізацію, повинні вказувати номер посвідчення про якість, дату виробництва і строку реалізації.

6. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

6.1. Мікробіологічні дослідження проводять відповідно з ГОСТ 26972-86, ГОСТ 10444.12-88 та ГОСТ 10444.15-94 в порядку державного санітарного надзору санітарно-епідеміологічної станції за затвердженими методикам.

6.2. Визначення органолептичних показників за ГОСТ 27668-88.

6.3. Визначення масової частки вологи за ГОСТ 13586.5-85.

6.4. Визначення фізико-хімічних показників БАД за ГФ Х1.

6.4. Визначення вмісту важких металів і миш'яка проводять за ГОСТ 26927-86, ГОСТ 26931-86, ГОСТ 26932-86, ГОСТ 26933-86, ГОСТ 26934-86. Періодичність контролю за вмістом важких металів і миш'яка встановлюються у відповідності із «Рекомендованим порядком контролю за вмістом токсичних елементів в продовольчій сировині і харчових продуктах».

6.7. Контроль якості сировини і матеріалів проводять згідно документам виданим підприємством-виробником, при вхідному контролі.

6.8. Масу нетто визначають зважуванням на вагах із допустимою погрішністю $\pm 0,25\%$ від фактичного навантаження.

7. ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ

7.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Біфіпропіонік™» розфасований в ПЕТ флакони по 0,4 г.

7.2. Функціональний харчовий інгредієнт «Біфіпропіонік™» поміщають в картонні коробки, котрі укладають в коробки і транспортують в грузових автомобілях, вагонах, трюмах суден, повітряному транспорті.

правилами перевезень при навантаженні повинні бути дотримані міри захисту від атмосферних опадів.

7.3. Маркування кожної пакувальної одиниці повинна проводитися згідно з ГОСТ 17768-90 із нанесенням наступних позначок:

- товарного знаку, назви, місцезнаходження і підчиненности підприємству- виробнику;
- дати виготовлення;
- маси нетто;
- номеру серії;
- термін придатності;
- умов зберігання;
- позначення справжніх технічних умов.

7.4. Зберігання функціонального харчового інгредієнту «Біфіпропіонік[™]» повинно проводитися в чистих, сухих приміщеннях при температурі 4-6°C.

8. ГАРАНТІЇ ПОСТАВНИКА

8.1. Підприємство-виробник гарантує відповідні вимоги цих технічних умов при дотриманні умов і строків зберігання, а також правил транспортування.

8.2. Гарантійний строк зберігання функціонального харчового інгредієнту «Біфіпропіонік[™]» 12 місяців з моменту виготовлення.

ДОДАТОК А

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Медико-біологічні вимоги і санітарні норми якості продовольчої сировини і харчових продуктів, затверджених Мінздравом № 5061-89 затвердж. 01.08.89 р.
2. СНИП II-4-79 Природне штучне освітлення.
3. ДСН 3.3.6.042-99 Державні санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.
4. ДСН 3.3.6.037-99 Державні санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку.
5. ДСП 201-97 Державні санітарні норми охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами).
6. СанПин 42-128-4690-88 Санитарные правила содержания территорий населенных мест.
7. СанПин 4630-88 Санитарные правила и нормы охраны поверхностных вод от загрязнений.
8. Пономарев, В.Д. Аналітична хімія: В 2 т. – М.: Вища школа, 1982. – Т.2: Кількісний аналіз. – 288 с.
9. Айвазов, Г.И. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции. – М.: Высшая школа, 1973. – 250 с.
10. Киселев, А.В. Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии. – М.: МГУ, 1973. – 448 с.

[illegible]

Додаток Б

Комітет по сільському господарству харчової і переробної
промисловості

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проектор з наукової роботи
Одеської національної академії
харчових технологій

Поварова Н. М.

2017р.



ТЕХНОЛОГІЧНА ІНСТРУКЦІЯ

По виробництву функціонального харчового інгредієнту
«Біфідопропіонік[™]»
(проект)
ТІ 24.14-02071062-001:2017

РОЗРОБЛЕНО:

Одеської національної академії
харчових технологій
Зав. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ
д.т.н., професор

Л. В. Капрелянц

«__» 2017р.

Асп. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ

Л. О. Крупницька

«__» 2017р.

Одеса,
2017р

ТІ 24.14-02071062-001:2017

Представлена технічна інструкція (далі ТІ) розповсюджуються на функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонік™», котрий включає симбіотичні культури *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4, отриманий біотехнологічним методом.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ

Для виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонікс™», використовують наступні сировину і матеріали:

- вода питна ГОСТ 2874-82;
- пробіотичні культури *Bifidobacterium longum* - Я 3 та *Propionibacterium shermanii* - 4;
- пептон ферментативний «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органу виконавчої влади в області охорони праці;
- сирна сироватка, яка має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органу виконавчої влади в області охорони праці;
- натрій оцтовокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органу виконавчої влади в області охорони праці;
- натрій фосфорнокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органу виконавчої влади в області охорони праці;
- аскорбінова кислота «ХЧ», котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органу виконавчої влади в області охорони праці;

ТІ 24.14-02071062-001:2017

- - соєва сироватка, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- натрій оцтово-кислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - сирна сироватка, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- кукурудзяний екстракт, котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - молоко знежирене, котре має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - желатоза, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- сахароза, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці.

Якість кожної партії сировини, котра надходить на переробку, перевіряється в лабораторії заводу. Сировина, котра не відповідає вимогам технічної документації, не допускається на виробництво.

2. ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА І ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

2.1. Технологічний процес виробництва функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонік™», повинен проводитись в умовах, гарантуючих високий санітарно-гігієнічний рівень підприємства, котре володіє можливістю проведення мікробіологічних досліджень.

ТІ 24.14-02071062-001:2017

Технологічна схема виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонік™», включає наступні етапи:

- підготовка добової культури *Bifidobacterium longum* - Я 3 та *Propionibacterium shermanii* - 4;
- приготування середовища культивування мікроорганізмів;
- стерилізація середовища культивування мікроорганізмів;
- охолодження середовища культивування мікроорганізмів до температури заквашування;
- внесення інокуляту добової культури *Bifidobacterium longum* -Я 3 та *Propionibacterium shermanii* - 4 середовище культивування;
- культивування мікроорганізмів у поживному середовищі;
- відділення симбіотичної біомаси біфідо- та пропіоновокислих бактерій від середовища культивування, шляхом центрифугування;
- додавання до отриманої симбіотичної біомаси мікроорганізмів захисного середовища;
- ліофільне висушування біомаси мікроорганізмів;
- розпушування;
- таблетування;
- фасування і упаковування функціонального харчового інгредієнту;
- транспортування і зберігання функціонального харчового інгредієнту.

2.2. Опис технологічного процесу виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонік™»

Підготовка добової культур *Bifidobacterium longum* - Я 3 та *Propionibacterium shermanii* - 4

2.2.1. Зразок культур (суха біомаса) *Bifidobacterium longum* - Я 3 та

Propionibacterium shermanii - 4 масою 50 мг розводять в 1 мл середовища

ТІ 24.14-02071062-001:2017

культивування, далі по 500 мкл розведеної культури засівають в 9,5 мл середовища культивування. Проби інкубують в термостаті при температурі 37 °С, протягом 24 годин. Отриману культуру в тому ж об'ємі засівають в стерильне середовище культивування та інкубують при вище згаданих умовах. Отримана добова культура служить посівним матеріалом.

Приготування середовища культивування мікроорганізмів

2.2.2. Для сумісного культивування *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 використовують середовище з додаванням соєвої сироватки, котре у своєму складі містить наступні компоненти, (мас.%):

соєва сироватка – 3 мас.%

сирна сироватка – 0,1 мас.%

пептон – 0,1 мас.%

аскорбінова кислота – 0,05 мас.%

натрій лимоннокислий тризаміщений – 0,6 мас.%

калій фосфорнокислий однозаміщений – 0,17 мас.%

магній сірчаноокислий – 0,12 мас.%

агар-агар – 0,25 мас.%

вода дистильована – до 100 мас.% об'єму

Значення рН середовища 6,7-7,0. .

Стерилізація середовища культивування мікроорганізмів

2.2.3. Середовище культивування стерилізують при 115-120°C, протягом 20 хвилин.

Охолодження середовища культивування мікроорганізмів до температури заквашування

2.2.4. Середовище культивування охолоджують до 30-35°C.

ТІ 24.14-02071062-001:2017

Внесення інокуляту добових культур *Bifidobacterium longum* – ЯЗ та *Propionibacterium shermanii* – 4 в середовище культивування

2.2.5. Добові культури *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 у співвідношенні 1:1 одночасно вносять в стерильне середовище культивування в рівних об'ємах у кількості 5% від загального об'єму середовища культивування.

Культивування мікроорганізмів у поживному середовищі

2.2.6. Культивування внесеної біомаси симбіотичних культур проводять в термостаті при 34°C, протягом 24 годин.

Відділення симбіотичної біомаси від середовища культивування, шляхом центрифугування

2.2.7. Отриману симбіотичну культуру *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 відділяють від середовища культивування, шляхом центрифугування при 10000 об/хв, протягом 10 хвилин. Отриману симбіотичну біомасу мікроорганізмів відділяють від супернатанту.

Додавання до отриманої симбіотичної біомаси мікроорганізмів захисного середовища

2.2.8. Отриману біомасу промивають дистильованою водою, після чого вносять захисне середовище. В якості захисного середовища використовують суміш, що містить наступні компоненти, %:

- сахароза – 50
- желатоза – 25
- молоко – 25.

Ліофільне висушування біомаси мікроорганізмів

ТІ 24.14-02071062-001:2017

2.2.11. Симбіотичну біомасу біфідо- та попіоновокислих бактерій заморожують рівним шаром і розміщують в холодильнику для загартовування.

2.2.12. Загартовування продукту проводять при температурі мінус 30 ± 1 °С, протягом 12 годин. В такому стані продукт зберігається до завантаження в сублімаційний апарат.

2.2.13. Початковий процес сушки характеризується зниженням тиску в сублімаційному апараті від атмосферного до $5 \cdot 10^{-1}$ чи $5 \cdot 10^{-2}$ мм.рт.ст. Через 1-1,5 години після включення вакуум-насосу включається підігрів, задля інтенсифікації процесу сублімації льоду, до температури не вище мінус 26 ± 1 °С.

2.2.14. Через 8 годин, від початку сушки, знижують температуру підігріву до 37 ± 1 °С. Для отримання сухого препарату із залишковою часткою вологи 2%, загальна тривалість сушки становить 20-24 години.

Розпушування

2.2.15. Після сушки продукт вивантажують в асептичних умовах і розпушують до розміру часток 0,25-0,5 мм.

Таблетування

2.2.16. Висушений і розпушений продукт подають в завантажувальний бункер пресу. Таблетування проводять при температурі нагріву матриці не вищій за 45 ± 1 °С, тиск 30 МПа, протягом 10 хв. Масова частка вологи в готовому продукті не повинна перевищувати 5%.

ТІ 24.14-02071062-001:2017

Фасування та упакування функціонального харчового інгредієнту

2.2.27. Висушений порошок біомаси симбіотичного консорціуму біфідо- та пропіоновокислих бактерій на фасувально-упаковувальному автоматі фасують в ПЕТ флакони по 0,4 гр. Флакони упаковують в картонні коробки по 10 шт.

Транспортування і зберігання функціонального харчового інгредієнту

2.2.18. Транспортування та збереження функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонікс™» згідно з ГОСТ 17768-90.

2.2.19. Гарантований строк зберігання функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонікс™» не більше 12 місяців при температурі 4-6 °С.

3. ОПИС МЕТОДІВ І ЗАСОБІВ КОНТРОЛЮ ЗА ТЕХНОЛОГІЧНИМ ПРОЦЕСОМ**3.1. Контроль технологічного процесу:**

Контроль температури здійснюють за допомогою термометрів ТГС-712 (межі вимірів яких становлять 0...150°C, клас точності 1). Контроль готової продукції проводять згідно вимогам ГФ XI, вип.2 і згідно з ОСТ 64-072-89.

4.ПРАВИЛА ПРИЙОМУ

4.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Біфідопропіонікс™» повинен прийматися партіями. Відбір і підготовка проб проводиться згідно з ГОСТ 15113.0, ГОСТ 26922, визначення органолептичних показників проводять згідно з ГОСТ 15113.3, ГОСТ 13586.2-81, масової частки вологи – згідно з ГОСТ 15113.4, ГОСТ 13586.5-85.

ТІ 24.14-02071062-001:2017

5. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

В 1 г функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонікс™» допускається наявність не більше 5×10^4 КМАФАнМ. Не допускається наявність плісневих грибів, дріжджів і бактерій групи кишкової палички.

Масову долю вологи визначають 1 раз в місяць.

Кожна партія функціонального харчового інгредієнту «Біфідопропіонікс™» повинна бути перевірена відділом (лабораторією) технічного контролю підприємства і забезпечена посвідченням про якість із вказанням інформації, переліченої в ТУ.

6. ЗАСОБИ ВИМІРІВ

Термометр ТГС-712, межі вимірів 0-150°C, клас точності 1.

Ваги настольні РН-10Ц12У. Межі зважування 0,1-10,0 кг. Ціна поділу 5 г.

Погрішність: 100-2500 г – 0,5 г; 2500-10000 г – $\pm 1,0\%$.

Додаток В

Комітет по сільському господарству харчової і переробної
промисловості

ДКП
«УЗГОДЖЕНО»
Перший замісник Головного
державного
Санітарного лікаря України
Висновок санітарно-гігієнічної
експертизи МОЗ України
Від _____ № _____

УКІД
«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Пректор з наукової роботи
Одеської національної академії
харчових технологій
Поварова Н. М.
_____ 2017р.



Функціональний харчовий інгредієнт

«БПМ™»

Технічні умови
(проект)

ТУ У 24.14-02071062-002:2017

Вводиться вперше

Строк введення з «__» _____ 2017р.
Строк дії до «__» _____ 2017р.

РОЗРОБЛЕНО:

Одеської національної академії
харчових технологій
Зав. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ
д.т.н., професор _____

Л. В. Капрелянц
«__» _____ 2017р.

Асп. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ

Л. О. Круницька
«__» _____ 2017р.

Одеса,
2017р

1. СФЕРА ВИКОРИСТАННЯ

Представлені технічні умови (далі ТУ) розповсюджуються на функціональний харчовий інгредієнт «БПМ[™]», котрий включає метаболіти симбіотичних культур *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4, отриманих біотехнологічним методом.

Область використання – для вживання в якості лікувально-профілактичних біологічно активних добавок широкого спектру дії для профілактики дисбактеріозів шлунково-кишкового тракту.

Представлені технічні умови являються власністю Л. В. Капрельянца та Л. О. Крупицької і не можуть бути використані інакше, як зі згодою з ними. Передача, тиражування і використання представлених технічних умов без офіційної згоди Л.В. Капрельянца та Л. О. Крупицької заборонено.

ТУ необхідно регулярно перевіряти, але не менше ніж одного разу в п'ять років після їх введення чи останньої перевірки, якщо не виникає потреба перевірити їх раніше у випадку прийняття нормативно-правових актів, відповідних державних (міждержавних) стандартів та інших нормативних документів, котрі регламентують інші вимоги, ніж ті, що були встановлені в цих ТУ.

Приклад позначення продукції при ідентифікації: «Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ[™]».

2. НОРМАТИВНІ ССИЛКИ

В представлених технічних умовах представлені силки на наступні нормативно-технічні документи.

ГОСТ 12.1.005-88	Загальні санітарно-технічні вимоги до повітря в робочій зоні.
ГОСТ 10444-12-88	Харчові продукти. Методи визначення дріжджів і пліснявих грибів.
ГОСТ 10444.15-94	Харчові продукти. Методи визначення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів.
ГОСТ 13586	Визначення органолептичних показників.
ГОСТ 13586.5-85	Визначення масової долі вологи.
ГОСТ 15113.2-77	Визначення домішок
ГОСТ 20996.1-2014	Селен технічний. Методи визначення селену.
ГОСТ 7933-89	Коробковий картон. Технічні умови.
ГОСТ 17768-90	Маркування вантажів
ГОСТ 18251-87	Стрічка клейка на паперовій основі. Технічні умови.
ГОСТ 25951-88	Плівка поліетиленова термостійка. Технічні умови
ГОСТ 26927-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення ртуті.
ГОСТ 26929-93	Сировина і продукти харчові. Підготовка проб. Мінералізація для визначення токсичних елементів.
ГОСТ 26930-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення миш'яка.

ГОСТ 26931-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення міді.
ГОСТ 26932-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення свинцю.
ГОСТ 26933-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення кадмію.
ГОСТ 26934-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення цинку.
ГОСТ 27668-88	Підготовка проб до аналізів.
ГОСТ 12.1.012-90	ССБТ. Вібраційна безпека. Загальні вимоги.
ГОСТ 12.1.003-83	ССБТ. Шум. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.1.050-86	ССБТ. Методи виміру шуму на робочих місцях.
ГОСТ 12.3.003-91	ССБТ. Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.3.002-75	ССБТ. Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.4.011-89	ССБТ. Засоби захисту працівників. Загальні вимоги і класифікація.
ГОСТ 3.3.6.142-99	Державні санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.
ГОСТ 201-97	Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць від забруднених хімічними та біологічними речовинами.
СНиП 2.04.05-91	Опалення, вентиляція і кондиціонування.
СНиП 2.04.05-87	Адміністративні і побутове приміщення.
СНиП 11-4-79	Природне та штучне освітлення.
СанПиН 42-123-4240-86	Допустимі кількості міграції (ДКМ) хімічних речовин, які виділяються із полімерних та інших

	матеріалів, що контактують із харчовими продуктами.
СанПиН 42-128-4690-88	Санітарні правила і норми по охороні ґрунту від забруднення побутовими і промисловими відходами.
СанПиН 4630-88	Санітарні правила і норми з охорони навколишнього середовища.
СанПиН 4946-89	Санітарні норми і правила з охорони поверхні вод від забруднення.
МР Мінздраву № 2273-80	Методичні рекомендації з визначення, ідентифікації афлотоксинів в харчових продуктах.
МБТ № 5061-89	Медико-біологічні вимоги і санітарні норми якості продовольчої сировини харчової продукції.
Наказ № 246 від 21.05.2007 р.	Положення про медичний огляд працівників певних категорій.
ОСТ 64-7-382-84	Аркуш-вкладиш. Технічні умови.

3. ТЕХНІЧНІ УМОВИ

3.1. Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ[™]», повинен виготовлятися відповідно до вимог представлених технічних умов, за технологічною інструкцією і правилами для виробництв харчової промисловості, затверджених в установленому порядку.

Органолептичні показники

Назва показників	Норма
Зовнішній вигляд	Кристалічний порошок
Смак і запах	Солодкуватий, без запаху
Колір	Світло-коричневий

3.3. За фізико-хімічними показниками функціональний харчовий інгредієнт «БПМ[™]», повинен відповідати вимогам вказаним в таблиці 2.

Таблиця 2

Фізико-хімічні показники

Назва показників	Норма
Сторонні домішки	Не допускаються
Масова частка вологи, % не більше	7,5

3.4. За мікробіологічними показниками функціональний харчовий інгредієнт «БПМ[™]», повинен відповідати вимогам, вказаним в таблиці 3.

Таблиця 3.

Мікробіологічні показники

Назва показників	Норма
КМАФАнМ, КУО в 1 г продукту, не більше	$2,5 \times 10^3$
Плісневі гриби, КУО в 1 г продукту	Не допускаються
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г продукту	Не допускаються
БГКП в 0,1 г продукту	Не допускаються

3.5. Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ™», повинен зберігатися при температурі 4-6° С не більше 12 місяців.

3.6. Вміст токсичних елементів в функціональному харчовому інгредієнті «БПМ™», не повинен перевищувати допустимі рівні (табл.4), встановлені «Медико-біологічними вимогами і санітарними нормами якості продовольчої сировини і харчових продуктів» № 5061-89, встановленими Мінздравом 01.08.89 р.

Таблиця 4

Допустимий вміст токсичних елементів в функціональному харчовому інгредієнті

Назва показника	Допустимі рівні (мг/кг), не більше
Токсичні елементи:	
Свинець	не більше 1,0
Кадмій	не більше 0,1
Ртуть	не більше 0,02
Миш'як	не більше 0,2
Мідь	не більше 20,0

3.7. Для виготовлення функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]», використовують наступну сировину і матеріали:

- вода питна ГОСТ 2874-82;
- пробіотичні культури *B.longum*-ЯЗ, *P. shermanii*-4;
- пептон ферментативний;
- сирна сироватка;
- пептон ферментативний;
- натрій оцтовокислий;
- калій фосфорнокислий;
- натрій фосфорнокислий;
- аскорбінова кислота;
- соєва сироватка;
- молоко;
- желатоза;
- сахароза.

При виробництві функціонального харчового інгредієнта «БПМ[™]», сировина повинна відповідати вимогам МБТ і СН № 5061, затвердженим 01.08.1999 р., за мікробіологічними показниками і допустимому вмісту токсичних елементів.

3.8. Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ [™]» запаковують по 0,4 г в ПЕТ флакони ГОСТ 25951. Відхилення від встановленої маси в одиниці упаковки не повинно перевищувати $\pm 1\%$.

3.9. Маркування кожної пакувальної одиниці проводиться відповідно до ГОСТ 17768-90 з нанесенням наступних позначок:

- товарного знаку, назви, місцезнаходження підприємства-виготовника;
- дати виготовлення;
- маси нетто;
- номеру партії;
- номеру серії;
- термін придатності;
- позначення представлених технічних умов.

4. ВИМОГИ ДО БЕЗПЕКИ, ВИМОГИ ОХОРОНИ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА, УТИЛІЗАЦІЯ

4.1. Технологічний процес виготовлення, функціонального харчового інгредієнту «БПМ [™]» в відповідності із ГОСТ 12.3.002-75 «Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.»

4.2. Температура зовнішньої поверхні приладів не повинна перевищувати 45° С.

4.3. Освітлення у виробничих приміщеннях повинно відповідати СНиП II-2.

4.4. Мікроклімат виробничих приміщень повинен відповідати ДСН 3.3.6.042.

4.5. Виробничі приміщення обладнують вентиляцією згідно СНиП 2.04.05.

4.6. Еквівалентний рівень шуму (шумове навантаження на робочих місцях) не повинен перевищувати 80 дБа згідно ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.003.

4.7. Еквівалентний коректований рівень загальної вібрації на робочих місцях не повинен перевищувати 92 дБ згідно ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.012.

4.8. Робітники забезпечують спецодягом, згідно галузевим нормам і санітарно- побутовим приміщенням згідно СНиП 2.09.04.

4.9. Робітники проходять періодичні медогляди згідно наказу МЗ № 45 від 31.03.94.

4.10. Контроль повітря робочої зони проводиться згідно ГОСТ 12.1.050., мікроклімату по ДСН 3.3.6.042.

4.11. Контроль рівня шуму проводиться по ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.050, вібрації по ГОСТ 12.1.012, ДСН 3.3.6.039.

4.12. Контроль стану навколишнього середовища, який включає охорону атмосферного повітря, контроль скиди стічних вод, охорону ґрунту, повинен проводитись відповідно із вимогами:

- атмосфера ДСП 201;
- поверхневі води СанПиН 4630;
- території населених пунктів СанПиН 42-128-4690.

4.13. Утилізація відходів виробництва у відповідності із санітарними нормами ВОЗ України.

5. ПРАВИЛА ПРИЙМАННЯ

5.1. Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ[™]» повинен прийматись партіями. Партією вважається кількість продукту, котра випускається за добу.

5.2. Приймально-здавальними партіями піддається кожна партія функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]» за органолептичними показниками, стану упаковки і маркування. Об'єм виробництва визначається за ГОСТ13586.3-83.

5.3. Фізико-хімічні показники є гарантійними і визначаються періодично не рідше ніж 1раз в один місяць аналітичними методами і за вимогами контролюючої організації.

5.4. Показники допустимої норми токсичних елементів, а також мікробіологічні показники визначають не рідше 1 разу в шість місяців, а також за вимогами органів державної і відомчої санітарної служби при наявності до цього відповідних показників.

5.5. Кожна партія продукту, що випускається повинна бути перевірена відділом технічного контролю (лабораторією) підприємства на відповідність вимогам справжнього стандарту і бути оформленою посвідченням по якості.

5.6. Оригінал посвідчення про якість зберігається в експедиції підприємства-виробника, а в документі, що супроводжує продукцію зі складу на реалізацію, повинні вказувати номер посвідчення про якість, дату виробництва і строку реалізації.

6. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

6.1. Мікробіологічні дослідження проводять відповідно з ГОСТ 26972-86, ГОСТ 10444.12-88 та ГОСТ 10444.15-94 в порядку державного санітарного надзору санітарно-епідеміологічної станції за затвердженими методикам.

6.2. Визначення органолептичних показників за ГОСТ 27668-88.

6.3. Визначення масової частки вологи за ГОСТ 13586.5-85.

6.4. Визначення фізико-хімічних показників БАД за ГФ Х1.

6.4. Визначення вмісту важких металів і миш'яка проводять за ГОСТ 26927-86, ГОСТ 26931-86, ГОСТ 26932-86, ГОСТ 26933-86, ГОСТ 26934-86. Періодичність контролю за вмістом важких металів і миш'яка встановлюються у відповідності із «Рекомендованим порядком контролю за вмістом токсичних елементів в продовольчій сировині і харчових продуктах».

6.7. Контроль якості сировини і матеріалів проводять згідно документам виданим підприємством-виробником, при вхідному контролі.

6.8. Масу нетто визначають зважуванням на вагах із допустимою погрішністю $\pm 0,25\%$ від фактичного навантаження.

7. ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ

7.1. Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ™» розфасований в ПЕТ флакони по 0,4 г.

7.2. Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ™» поміщають в картонні коробки, котрі укладають в коробки і транспортують в грузових автомобілях, ваготан, трюмах суден, повітряному транспорті. Згідно з правилами перевезень при навантаженні повинні бути дотримані міри захисту від атмосферних опадів.

7.3. Маркування кожної пакувальної одиниці повинна проводитися згідно з ГОСТ 17768-90 із нанесенням наступних позначок:

- товарного знаку, назви, місцезнаходження і підчиненности підприємству- виробнику;
- дати виготовлення;
- маси нетто;
- номеру серії;
- термін придатності;
- умов зберігання;
- позначення справжніх технічних умов.

7.4. Зберігання функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]» повинно проводитися в чистих, сухих приміщеннях при температурі 4-6°С.

8. ГАРАНТІЇ ПОСТАВНИКА

8.1. Підприємство-виробник гарантує відповідні вимоги цих технічних умов при дотриманні умов і строків зберігання, а також правил транспортування.

8.2. Гарантійний строк зберігання функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]» 12 місяців з моменту виготовлення.

ДОДАТОК А

БІБЛІОГРАФІЯ

11. Медико-біологічні вимоги і санітарні норми якості продовольчої сировини і харчових продуктів, затверджених Мінздравом № 5061-89 затвердж. 01.08.89 р.
12. СніП II-4-79 Природне штучне освітлення.
13. ДСН 3.3.6.042-99 Державні санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.
14. ДСН 3.3.6.037-99 Державні санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку.
15. ДСП 201-97 Державні санітарні норми охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами).
16. СанПин 42-128-4690-88 Санитарные правила содержания территорий населенных мест.
17. СанПин 4630-88 Санитарные правила и нормы охраны поверхностных вод от загрязнений.
18. Пономарев, В.Д. Аналітична хімія: В 2 т. – М.: Вища школа, 1982. – Т.2: Кількісний аналіз. – 288 с.
19. Айвазов, Г.И. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции. – М.: Высшая школа, 1973. – 250 с.
20. Киселев, А.В. Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии. – М.: МГУ, 1973. – 448 с.

[illegible]

Додаток Г

Комітет по сільському господарству харчової і переробної
промисловості

ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проектор з наукової роботи
Одеської національної академії
харчових технологій

Поварова Н. М.

2017р.



ТЕХНОЛОГІЧНА ІНСТРУКЦІЯ

По виробництву функціонального харчового інгредієнту
«БПМ™»
(проект)
ТІ 24.14-02071062-002:2017

РОЗРОБЛЕНО:

Одеської національної академії
харчових технологій
Зав. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ
д.т.н., професор

Л. В. Капрельянц

2017р.

Асп. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ

Л. О. Крупицька

2017р.

Одеса,
2017р

Представлена технічна інструкція (далі ТІ) розповсюджуються на функціональний харчовий інгредієнт «БПМ™», котрий включає метаболіти симбіотичних культур *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4, отриманих біотехнологічним методом.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ

Для виготовлення функціонального харчового інгредієнту «БПМ™», використовують наступні сировину і матеріали:

- вода питна ГОСТ 2874-82;
- пробіотичні культури *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4;
- пептон ферментативний «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- сирна сироватка, яка має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- натрій оцтовокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- калій фосфорнокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- натрій фосфорнокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;

- - аскорбінова кислота «ХЧ», котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - соєва сироватка, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- натрій оцтово-кислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - сирна сироватка, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - молоко знежирене, котре має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - желатоза, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - сахароза, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці.

Якість кожної партії сировини, котра надходить на переробку, перевіряється в лабораторії заводу. Сировина, котра не відповідає вимогам технічної документації, не допускається на виробництво.

2. ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА І ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

2.1. Технологічний процес виробництва функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]», повинен проводитись в умовах, гарантуючих високий санітарно-гігієнічний рівень підприємства, котре володіє можливістю проведення мікробіологічних досліджень.

Технологічна схема виготовлення функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]», включає наступні етапи:

- підготовка добових культур *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4;
- приготування середовища культивування мікроорганізмів;
- стерилізація середовища культивування мікроорганізмів;
- охолодження середовища культивування мікроорганізмів до температури заквашування;
- внесення інокуляту добової культури *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 середовище культивування;
- культивування мікроорганізмів у поживному середовищі;
- відділення симбіотичної біомаси біфідо- та пропіоновокислих бактерій від середовища культивування, шляхом центрифугування;
- термічна обробка отриманого супернатанту, що містить продукти метаболізму;
- додавання до отриманого супернатанту симбіотичних мікроорганізмів захисного середовища;
- ліофільне висушування супернатанту;
- розпушування;
- таблетування;
- фасування і упаковування функціонального харчового інгредієнту;
- транспортування і зберігання функціонального харчового інгредієнту.

2.2. Опис технологічного процесу виготовлення функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]»

Підготовка добової культури

2.2.1. Зразок культур (суха біомаса) *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 масою 50 мг розводять в 1 мл середовища культивування, далі по 500 мкл розведеної культури засівають в 9,5 мл середовища культивування. Проби інкубують в термостаті при температурі 37 °С, протягом 24 годин. Отриману культуру в тому ж об'ємі засівають в стерильне середовище культивування та інкубують при вище згаданих умовах. Отримана добова культура служить посівним матеріалом.

Приготування середовища культивування мікроорганізмів

2.2.2. Для сумісного культивування *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 використовують середовище з додаванням соєвої сироватки, котре у своєму складі містить наступні компоненти, (мас.%):

соєва сироватка – 3 мас.%

сирна сироватка – 0,1 мас.%

пептон – 0,1 мас.%

аскорбінова кислота – 0,05 мас.%

натрій лимоннокислий тризаміщений – 0,6 мас.%

калій фосфорнокислий однозаміщений – 0,17 мас.%

магній сірчаноокислий – 0,12 мас.%

агар-агар – 0,25 мас.%

вода дистильована – до 100 мас.% об'єму

Значення рН середовища 6,7-7,0. .

Стерилізація середовища культивування мікроорганізмів

2.2.3. Середовище культивування стерилізують при 115-120°C, протягом 20 хвилин.

Охолодження середовища культивування мікроорганізмів до температури заквашування

2.2.4. Середовище культивування охолоджують до 30-35°C.

Внесення інокуляту добових культур *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 в середовище культивування

2.2.5. Добові культури *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 у співвідношенні 1:1 одночасно вносять в стерильне середовище культивування в рівних об'ємах у кількості 5% від загального об'єму середовища культивування.

Культивування мікроорганізмів у поживному середовищі

2.2.6. Культивування внесеної біомаси симбіотичних культур проводять в термостаті при 34°C, протягом 24 годин.

Відділення біомаси симбіотичного консорціуму від середовища культивування, шляхом центрифугування

2.2.7. Отриману симбіотичну культуру *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 відділяють від середовища культивування, шляхом центрифугування при 10000 об/хв, протягом 10 хвилин. Отриману селензбагачену біомасу мікроорганізмів відділяють від супернатанту.

Термічна обробка отриманого супернатанту, що містить продукти метаболізму симбіотичного консорціуму

2.2.8. Отриманий супернатант, що містить продукти метаболізму симбіотичного консорціуму *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4, піддають термічній обробці за температури 65 °C протягом 45 хвилин.

- Додавання до отриманого супернатанту захисного середовища

2.2.9. До отриманий супернатанту вносять захисне середовище. В якості захисного середовища використовують суміш, що містить наступні компоненти, %:

- сахароза – 50
- желатоза – 25
- молоко – 25.

Ліофільне висушування супернатанту

2.2.11. Метаболіти симбіотичної біомаси біфідо- та попіоновокислих бактерій заморожують рівним шаром і розміщують в холодильнику для загартовування.

2.2.12. Загартовування продукту проводять при температурі мінус 30 ± 1 °С, протягом 12 годин. В такому стані продукт зберігається до завантаження в сублімаційний апарат.

2.2.13. Початковий процес сушки характеризується зниженням тиску в сублімаційному апараті від атмосферного до $5 \cdot 10^{-1}$ чи $5 \cdot 10^{-2}$ мм.рт.ст. Через 1-1,5 години після включення вакуум-насосу включається підігрів, задля інтенсифікації процесу сублімації льоду, до температури не вище мінус 26 ± 1 °С.

2.2.14. Через 8 годин, від початку сушки, знижують температуру підігріву до 37 ± 1 °С. Для отримання сухого препарату із залишковою часткою вологи 2%, загальна тривалість сушки становить 20-24 години.

Розпушування

2.2.15. Після сушки продукт вивантажують в асептичних умовах і розпушують до розміру часток 0,25-0,5 мм.

Таблетування

2.2.16. Висушений і розпушений продукт подають в завантажувальний бункер пресу. Таблетування проводять при температурі нагріву матриці не

ТІ 24.14-02071062-002:2017

вищий за 45 ± 1 °С, тиск 30 МПа, протягом 10 хв. Масова частка вологи в готовому продукті не повинна перевищувати 5%.

Фасування та упакування функціонального харчового інгредієнту

2.2.17. Висушений порошок супернатанту симбіотичного консорціуму на фасувально-упаковувальному автоматі фасують в ПЕТ флакони по 0,4 гр. Флакони упаковують в картонні коробки по 10 шт.

Транспортування і зберігання функціонального харчового інгредієнту

2.2.18. Транспортування та збереження функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]» згідно з ГОСТ 17768-90.

2.2.19. Гарантований строк зберігання функціонального харчового інгредієнту «БПМ[™]» не більше 12 місяців при температурі 4-6 °С.

3. ОПИС МЕТОДІВ І ЗАСОБІВ КОНТРОЛЮ ЗА ТЕХНОЛОГІЧНИМ ПРОЦЕСОМ

3.1. Контроль технологічного процесу:

Контроль температури здійснюють за допомогою термометрів ТГС-712 (межі вимірів яких становлять 0...150°С, клас точності 1). Контроль готової продукції проводять згідно вимогам ГФ XI, вип.2 і згідно з ОСТ 64-072-89.

4.ПРАВИЛА ПРИЙОМУ

4.1. Функціональний харчовий інгредієнт «БМП[™]» повинен прийматися партіями. Відбір і підготовка проб проводиться згідно з ГОСТ 15113.0, ГОСТ 26922, визначення органолептичних показників проводять згідно з ГОСТ 15113.3, ГОСТ 13586.2-81, масової частки вологи – згідно з ГОСТ 15113.4, ГОСТ 13586.5-85.

5. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

В 1 г функціонального харчового інгредієнту «БМП™» допускається наявність не більше 5×10^4 КМАФАнМ. Не допускається наявність плісневих грибів, дріжджів і бактерій групи кишкової палички.

Масову долю вологи визначають 1 раз в місяць.

Кожна партія функціонального харчового інгредієнту «БМП™» повинна бути перевірена відділом (лабораторією) технічного контролю підприємства і забезпечена посвідченням про якість із вказанням інформації, переліченої в ТУ.

6. ЗАСОБИ ВИМІРІВ

Термометр ТГС-712, межі вимірів 0-150°C, клас точності 1.

Ваги настольні РН-10Ц12У. Межі зважування 0,1-10,0 кг. Ціна поділу 5 г.

Погрішність: 100-2500 г – 0,5 г; 2500-10000 г – $\pm 1,0\%$.

Додаток Д

Комітет по сільському господарству харчової і переробної
промисловості

ДКПП
«УЗГОДЖЕНО»
Перший замісник Головного
державного
Санітарного лікаря України
Висновок санітарно-гігієнічної
експертизи МОЗ України
Від _____ № _____

УКІД
«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проектор з наукової роботи
Одеської національної академії
харчових технологій
Поварова Н. М.
_____ 2017р.



Функціональний харчовий інгредієнт
«Бігестім™»
Технічні умови
(проект)
ТУ У 24.14-02071062-003:2017
Вводиться вперше

Строк введення з «__» _____ 2017р.
Строк дії до «__» _____ 2017р.

РОЗРОБЛЕНО:

Одеської національної академії
харчових технологій
Зав. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ
д.т.н. професор

Л. В. Капрельянц
«__» _____ 2017р.

Асп. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ
Л. О. Крупицька
«__» _____ 2017р.

Одеса,
2017р

1. СФЕРА ВИКОРИСТАННЯ

Представлені технічні умови (далі ТУ) розповсюджуються на функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]», котрий включає метаболіти культури *Propionibacterium shermanii* – 4, отриманих біотехнологічним методом.

Область використання – для вживання в якості лікувально-профілактичних біологічно активних добавок широкого спектру дії для профілактики дисбактеріозів шлунково-кишкового тракту.

Представлені технічні умови являються власністю Л. В. Капрельянца та Л. О. Крупицької і не можуть бути використані інакше, як зі згодою з ними. Передача, тиражування і використання представлених технічних умов без офіційної згоди Л.В. Капрельянца та Л. О. Крупицької заборонено.

ТУ необхідно регулярно перевіряти, але не менше ніж одного разу в п'ять років після їх введення чи останньої перевірки, якщо не виникає потреба перевірити їх раніше у випадку прийняття нормативно-правових актів, відповідних державних (міждержавних) стандартів та інших нормативних документів, котрі регламентують інші вимоги, ніж ті, що були встановлені в цих ТУ.

Приклад позначення продукції при ідентифікації: «Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]»

2. НОРМАТИВНІ СИЛКИ

В представлених технічних умовах представлені силки на наступні нормативно-технічні документи.

ГОСТ 2874-82	Вода питна. Гігієнічні вимоги і контроль за якістю.
ГОСТ 12.1.005-88	Загальні санітарно-технічні вимоги до повітря в робочій зоні.
ГОСТ 10444-12-88	Харчові продукти. Методи визначення дріжджів і пліснявих грибів.
ГОСТ 10444.15-94	Харчові продукти. Методи визначення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів.
ГОСТ 13586	Визначення органолептичних показників.
ГОСТ 13586.5-85	Визначення масової долі вологи.
ГОСТ 15113.2-77	Визначення домішок
ГОСТ 20996.1-2014	Селен технічний. Методи визначення селену.
ГОСТ 7933-89	Коробковий картон. Технічні умови.
ГОСТ 17768-90	Маркування вантажів
ГОСТ 18251-87	Стрічка клейка на паперовій основі. Технічні умови.
ГОСТ 25951-88	Плівка поліетиленова термостійка. Технічні умови
ГОСТ 26927-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення ртуті.
ГОСТ 26929-93	Сировина і продукти харчові. Підготовка проб. Мінералізація для визначення токсичних елементів.

ГОСТ 26930-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення миш'яка.
ГОСТ 26931-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення міді.
ГОСТ 26932-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення свинцю.
ГОСТ 26933-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення кадмію.
ГОСТ 26934-86	Сировина і продукти харчові. Метод визначення цинку.
ГОСТ 27668-88	Підготовка проб до аналізів.
ГОСТ 12.1.012-90	ССБТ. Вібраційна безпека. Загальні вимоги.
ГОСТ 12.1.003-83	ССБТ. Шум. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.1.050-86	ССБТ. Методи виміру шуму на робочих місцях.
ГОСТ 12.3.003-91	ССБТ. Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.3.002-75	ССБТ. Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.
ГОСТ 12.4.011-89	ССБТ. Засоби захисту працівників. Загальні вимоги і класифікація.
ГОСТ 3.3.6.142-99	Державні санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.
ГОСТ 201-97	Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць від забруднених хімічними та біологічними речовинами.
СНиП 2.04.05-91	Опалення, вентиляція і кондиціонування.
СНиП 2.04.05-87	Адміністративні і побутове приміщення.
СНиП 11-4-79	Природне та штучне освітлення.

СанПиН 42-123-4240-86	Допустимі кількості міграції (ДКМ) хімічних речовин, які виділяються із полімерних та інших матеріалів, що контактують із харчовими продуктами.
СанПиН 42-128-4690-88	Санітарні правила і норми по охороні ґрунту від забруднення побутовими і промисловими відходами.
СанПиН 4630-88	Санітарні правила і норми з охорони навколишнього середовища.
СанПиН 4946-89	Санітарні норми і правила з охорони поверхні вод від забруднення.
МР Мінздраву № 2273-80	Методичні рекомендації з визначення, ідентифікації афлотоксинів в харчових продуктах.
МБТ № 5061-89	Медико-біологічні вимоги і санітарні норми якості продовольчої сировини харчової продукції.
Наказ № 246 від 21.05.2007 р.	Положення про медичний огляд працівників певних категорій.
ОСТ 64-7-382-84	Аркуш-вкладиш. Технічні умови.

3. ТЕХНІЧНІ УМОВИ

3.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]», повинен виготовлятися відповідно до вимог представлених технічних умов, за технологічною інструкцією і правилами для виробництв харчової промисловості, затверджених в установленому порядку.

3.2. За органолептичними показниками функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]», отриманий біотехнологічним методом, повинен відповідати вимогам, вказаним в таблиці 1.

Таблиця 1

Органолептичні показники

Назва показників	Норма
Зовнішній вигляд	Кристалічний порошок
Смак і запах	Солодкуватий, без запаху
Колір	Світло-коричневий

3.3. За фізико-хімічними показниками функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]», повинен відповідати вимогам вказаним в таблиці 2.

Таблиця 2

Фізико-хімічні показники

Назва показників	Норма
Сторонні домішки	Не допускаються
Масова частка вологи, % не більше	7,5

3.4. За мікробіологічними показниками функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]», повинен відповідати вимогам, вказаним в таблиці 3.

Таблиця 3.

Мікробіологічні показники

Назва показників	Норма
КМАФАнМ, КУО в 1 г продукту, не більше	$2,5 \times 10^3$
Плісневі гриби, КУО в 1 г продукту	Не допускаються
Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 25 г продукту	Не допускаються
БГКП в 0,1 г продукту	Не допускаються

3.5. Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]», повинен зберігатися при температурі 4-6° С не більше 12 місяців.

3.6. Вміст токсичних елементів в функціональному харчовому інгредієнті «Бігестім[™]», не повинен перевищувати допустимі рівні (табл.4), встановлені «Медико-біологічними вимогами і санітарними нормами якості продовольчої сировини і харчових продуктів» № 5061-89, встановленими Мінздравом 01.08.89 р.

Таблиця 4

Допустимий вміст токсичних елементів в функціональному харчовому інгредієнті

Назва показника	Допустимі рівні (мг/кг), не більше
Токсичні елементи:	
Свинець	не більше 1,0
Кадмій	не більше 0,1
Ртуть	не більше 0,02
Миш'як	не більше 0,2
Мідь	не більше 20,0

3.7. Для виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Бігестім[™]», використовують наступну сировину і матеріали:

- вода питна ГОСТ 2874-82;
- пробіотичну культуру *P. shermanii*-4;
- пептон ферментативний;
- сирна сироватка;
- пептон ферментативний;
- натрій оцтовокислий;
- калій фосфорнокислий;
- натрій фосфорнокислий;
- аскорбінова кислота;
- соєва сироватка;
- молоко;
- желатоза;
- сахароза.

При виробництві функціонального харчового інгредієнта «Бігестім[™]», сировина повинна відповідати вимогам МБТ і СН № 5061, затвердженим 01.08.1999 р., за мікробіологічними показниками і допустимому вмісту токсичних елементів.

3.8. Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]» запаковують по 0,4 г в ПЕТ флакони ГОСТ 25951. Відхилення від встановленої маси в одиниці упаковки не повинно перевищувати $\pm 1\%$.

3.9. Маркування кожної пакувальної одиниці проводиться відповідно до ГОСТ 17768-90 з нанесенням наступних позначок:

- товарного знаку, назви, місцезнаходження підприємства-виготовника;
- дати виготовлення;
- маси нетто;
- номеру партії;
- номеру серії;
- термін придатності;
- позначення представлених технічних умов.

4. ВИМОГИ ДО БЕЗПЕКИ, ВИМОГИ ОХОРОНИ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА, УТИЛІЗАЦІЯ

4.1. Технологічний процес виготовлення, функціонального харчового інгредієнту «Бігестім[™]» в відповідності із ГОСТ 12.3.002-75 «Процеси виробничі. Загальні вимоги безпеки.»

4.2. Температура зовнішньої поверхні приладів не повинна перевищувати 45° С.

4.3. Освітлення у виробничих приміщеннях повинно відповідати СНиП II-2.

4.4. Мікроклімат виробничих приміщень повинен відповідати ДСН 3.3.6.042.

4.5. Виробничі приміщення обладнують вентиляцією згідно СНиП 2.04.05.

4.6. Еквівалентний рівень шуму (шумове навантаження на робочих місцях) не повинен перевищувати 80 дБа згідно ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.003.

4.7. Еквівалентний коректований рівень загальної вібрації на робочих місцях не повинен перевищувати 92 дБ згідно ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.012.

4.8. Робітники забезпечують спецодягом, згідно галузевим нормам і санітарно- побутовим приміщенням згідно СНиП 2.09.04.

4.9. Робітники проходять періодичні медогляди згідно наказу МЗ № 45 від 31.03.94.

4.10. Контроль повітря робочої зони проводиться згідно ГОСТ 12.1.050., мікроклімату по ДСН 3.3.6.042.

4.11. Контроль рівня шуму проводиться по ДСН 3.3.6.037, ГОСТ 12.1.050, вібрації по ГОСТ 12.1.012, ДСН 3.3.6.039.

4.12. Контроль стану навколишнього середовища, який включає охорону атмосферного повітря, контроль скиди стічних вод, охорону ґрунту, повинен проводитись відповідно із вимогами:

- атмосфера ДСП 201;
- поверхневі води СанПиН 4630;
- території населених пунктів СанПиН 42-128-4690.

4.13. Утилізація відходів виробництва у відповідності із санітарними нормами ВОЗ України.

5. ПРАВИЛА ПРИЙМАННЯ

5.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]» повинен прийматись партіями. Партією вважається кількість продукту, котра випускається за добу.

5.2. Приймально-здавальними партіями піддається кожна партія функціонального харчового інгредієнту «Бігестім[™]» за органолептичними показниками, стану упаковки і маркування. Об'єм виробництва визначається за ГОСТ13586.3-83.

5.3. Фізико-хімічні показники є гарантійними і визначаються періодично не рідше ніж 1раз в один місяць аналітичними методами і за вимогами контролюючої організації.

5.4. Показники допустимої норми токсичних елементів, а також мікробіологічні показники визначають не рідше 1 разу в шість місяців, а також за вимогами органів державної і відомчої санітарної служби при наявності до цього відповідних показників.

5.5. Кожна партія продукту, що випускається повинна бути перевірена відділом технічного контролю (лабораторією) підприємства на відповідність вимогам справжнього стандарту і бути оформленою посвідченням по якості.

5.6. Оригінал посвідчення про якість зберігається в експедиції підприємства-виробника, а в документі, що супроводжує продукцію зі складу на реалізацію, повинні вказувати номер посвідчення про якість, дату виробництва і строку реалізації.

6. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

6.1. Мікробіологічні дослідження проводять відповідно з ГОСТ 26972-86, ГОСТ 10444.12-88 та ГОСТ 10444.15-94 в порядку державного санітарного надзору санітарно-епідеміологічної станції за затвердженими методикам.

6.2. Визначення органолептичних показників за ГОСТ 27668-88.

6.3. Визначення масової частки вологи за ГОСТ 13586.5-85.

6.4. Визначення фізико-хімічних показників БАД за ГФ Х1.

6.4. Визначення вмісту важких металів і миш'яка проводять за ГОСТ 26927-86, ГОСТ 26931-86, ГОСТ 26932-86, ГОСТ 26933-86, ГОСТ 26934-86. Періодичність контролю за вмістом важких металів і миш'яка встановлюються у відповідності із «Рекомендованим порядком контролю за вмістом токсичних елементів в продовольчій сировині і харчових продуктах».

6.7. Контроль якості сировини і матеріалів проводять згідно документам виданим підприємством-виробником, при вхідному контролі.

6.8. Масу нетто визначають зважуванням на вагах із допустимою погрешністю $\pm 0,25\%$ від фактичного навантаження.

7. ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ

7.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]» розфасований в ПЕТ флакони по 0,4 г.

7.2. Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім[™]» поміщають в картонні коробки, котрі укладають в коробки і транспортують в грузових автомобілях, вагонах, трюмах суден, повітряному транспорті. Згідно з правилами перевезень при навантаженні повинні бути дотримані міри захисту від атмосферних опадів.

7.3. Маркування кожної пакувальної одиниці повинна проводитися згідно з ГОСТ 17768-90 із нанесенням наступних позначок:

- товарного знаку, назви, місцезнаходження і підчиненности підприємству- виробнику;
- дати виготовлення;
- маси нетто;
- номеру серії;
- термін придатності;
- умов зберігання;
- позначення справжніх технічних умов.

7.4. Зберігання функціонального харчового інгредієнту «Бігестім TM» повинно проводитися в чистих, сухих приміщеннях при температурі 4-6°C.

8. ГАРАНТІЇ ПОСТАВНИКА

8.1. Підприємство-виробник гарантує відповідні вимоги цих технічних умов при дотриманні умов і строків зберігання, а також правил транспортування.

8.2. Гарантійний строк зберігання функціонального харчового інгредієнту «Бігестім TM» 12 місяців з моменту виготовлення.

ДОДАТОК А

БІБЛІОГРАФІЯ

2. Медико-біологічні вимоги і санітарні норми якості продовольчої сировини і харчових продуктів, затверджених Мінздравом № 5061-89 затвердж. 01.08.89 р.
3. СНИП II-4-79 Природне штучне освітлення.
4. ДСН 3.3.6.042-99 Державні санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень.
5. ДСН 3.3.6.037-99 Державні санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку.
6. ДСП 201-97 Державні санітарні норми охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами).
7. СанПин 42-128-4690-88 Санитарные правила содержания территорий населенных мест.
8. СанПин 4630-88 Санитарные правила и нормы охраны поверхностных вод от загрязнений.
9. Пономарев, В.Д. Аналітична хімія: В 2 т. – М.: Вища школа, 1982. – Т.2: Кількісний аналіз. – 288 с.
10. Айвазов, Г.И. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции. – М.: Высшая школа, 1973. – 250 с.
11. Киселев, А.В. Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии. – М.: МГУ, 1973. – 448 с.

ЛИСТ РЕЭСТРАЦІЇ ЗМІН ТУ

[illegible]

Додаток Е

Комітет по сільському господарству харчової і переробної
промисловості

ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проектор з наукової роботи
Одеської національної академії
харчових технологій

Поварова Н. М.

2017р.



ТЕХНОЛОГІЧНА ІНСТРУКЦІЯ

По виробництву функціонального харчового інгредієнту

«Бігестім™»

(проект)

ТІ 24.14-02071062-003:2017

РОЗРОБЛЕНО:

Одеської національної академії
харчових технологій

Зав. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ
д.т.н., професор

Л. В. Капрельянц

« » 2017р.

Асп. каф. біохімії, мікробіології
і фізіології харчування ОНАХТ

Л. О. Крупицька

« » 2017р.

Одеса,
2017р

Представлена технічна інструкція (далі ТІ) розповсюджуються на функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім», котрий включає метаболіти пробіотичної культури *Propionibacterium shermanii* – 4, отриманих біотехнологічним методом.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ

Для виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Бігестім», використовують наступні сировину і матеріали:

- вода питна ГОСТ 2874-82;
- пробіотична культура *Propionibacterium shermanii* – 4;
- - пептон ферментативний «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - сирна сироватка, яка має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - натрій оцтовокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - калій фосфорнокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - натрій фосфорнокислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - аскорбінова кислота «ХЧ», котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - соєва сироватка, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;

- котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- натрій оцтово-кислий «ХЧ», котрий має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - сирна сироватка, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - молоко знежирене, котре має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - желатоза, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці;
- - сахароза, котра має санітарно-епідеміологічний висновок центрального органа виконавчої влади в області охорони праці.

Якість кожної партії сировини, котра надходить на переробку, перевіряється в лабораторії заводу. Сировина, котра не відповідає вимогам технічної документації, не допускається на виробництво.

2. ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА І ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

2.1. Технологічний процес виробництва функціонального харчового інгредієнту «Бігестім», повинен проводитись в умовах, гарантуючих високий санітарно-гігієнічний рівень підприємства, котре володіє можливістю проведення мікробіологічних досліджень.

Технологічна схема виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Бігестім», включає наступні етапи:

- підготовка добової культури та *Propionibacterium shermanii* – 4;
- приготування середовища культивування мікроорганізмів;
- стерилізація середовища культивування мікроорганізмів;
- охолодження середовища культивування мікроорганізмів до температури заквашування;
- внесення інокуляту добової культури *Propionibacterium shermanii* - 4 середовище культивування;
- культивування мікроорганізмів у поживному середовищі;
- відділення біомаси пропіоновокислих бактерій від середовища культивування, шляхом центрифугування;
- термічна обробка отриманого супернатанту, що містить продукти метаболізму;
- додавання до отриманого супернатанту пропіоновокислих бактерій захисного середовища;
- ліофільне висушування супернатанту;
- розпушування;
- таблетування;
- фасування і упаковування функціонального харчового інгредієнту;
- транспортування і зберігання функціонального харчового інгредієнту.

2.2. Опис технологічного процесу виготовлення функціонального харчового інгредієнту «Бігестім[™]»

Підготовка добової культури *Propionibacterium shermanii* – 4

2.2.1. Зразок культури (суха біомаса) *Propionibacterium shermanii* – 4 масою 50 мг розводять в 1 мл середовища культивування, далі по 500 мкл розведеної культури засівають в 9,5 мл середовища культивування. Проби інкубують в термостаті при температурі 30 °С, протягом 24 годин. Отриману культуру в тому ж об'ємі засівають в стерильне середовище культивування та

інкубують при вище згаданих умовах. Отримана добова культура служить посівним матеріалом.

Приготування середовища культивування мікроорганізмів

2.2.2. Для культивування *Propionibacterium shermanii* – 4 використовують середовище з додаванням соєвої

сироватки, котре у своєму складі містить наступні компоненти, (мас.%):

соєва сироватка – 3 мас.%

сирна сироватка – 0,1 мас.%

пептон – 0,1 мас.%

аскорбінова кислота – 0,05 мас.%

натрій лимоннокислий тризаміщений – 0,6 мас.%

калій фосфорнокислий однозаміщений – 0,17 мас.%

магній сірчаноокислий – 0,12 мас.%

агар-агар – 0,25 мас.%

вода дистильована – до 100 мас.% об'єму

Значення рН середовища 6,7-7,0. .

Стерилізація середовища культивування мікроорганізмів

2.2.3. Середовище культивування стерилізують при 115-120°C, протягом 20 хвилин.

Охолодження середовища культивування мікроорганізмів до температури заквашування

2.2.4. Середовище культивування охолоджують до 30-35°C.

Внесення інокуляту добової культури *Propionibacterium shermanii* – 4 в середовище культивування

2.2.5. Добову культуру *Propionibacterium shermanii* – 4 вносять в стерильне середовище культивування у кількості 5% від загального об'єму середовища культивування.

Культивування мікроорганізмів у поживному середовищі

2.2.6. Культивування внесеної біомаси симбіотичних культур проводять в термостаті при 30°C, протягом 24 годин.

Відділення біомаси симбіотичного консорціуму від середовища культивування, шляхом центрифугування

2.2.7. Отриману біомас культури *Propionibacterium shermanii* – 4 відділяють від середовища культивування, шляхом центрифугування при 10000 об/хв, протягом 10 хвилин. Отриману селензбагачену біомасу мікроорганізмів відділяють від супернатанту.

Термічна обробка отриманого супернатанту, що містить продукти метаболізму симбіотичного консорціуму

- i. Отриманий супернатант, що містить продукти метаболізму *Propionibacterium shermanii* – 4, піддають термічній обробці за температурі 65 °C протягом 45 хвилин.

Додавання до отриманого супернатанту захисного середовища

2.2.9. До отриманий супернатанту вносять захисне середовище. В якості захисного середовища використовують суміш, що містить наступні компоненти, %:

- сахароза – 50
- желатоза – 25
- молоко – 25.

Ліофільне висушування супернатанту

2.2.11. Метаболіти симбіотичної біомаси біфідо- та попіоновокислих бактерій заморожують рівним шаром і розміщують в холодильнику для загартовування.

ТІ 24.14-02071062-003:2017

2.2.12. Загартування продукту проводять при температурі мінус 30 ± 1 °С, протягом 12 годин. В такому стані продукт зберігається до завантаження в сублімаційний апарат.

2.2.13. Початковий процес сушки характеризується зниженням тиску в сублімаційному апараті від атмосферного до $5 \cdot 10^{-1}$ чи $5 \cdot 10^{-2}$ мм.рт.ст. Через 1-1,5 години після включення вакуум-насосу включається підігрів, задля інтенсифікації процесу сублімації льоду, до температури не вище мінус 26 ± 1 °С.

2.2.14. Через 8 годин, від початку сушки, знижують температуру підігріву до 37 ± 1 °С. Для отримання сухого препарату із залишковою часткою вологи 2%, загальна тривалість сушки становить 20-24 години.

Розпушування

2.2.15. Після сушки продукт вивантажують в асептичних умовах і розпушують до розміру часток 0,25-0,5 мм.

Таблетування

2.2.16. Висушений і розпушений продукт подають в завантажувальний бункер пресу. Таблетування проводять при температурі нагріву матриці не вищій за 45 ± 1 °С, тиск 30 МПа, протягом 10 хв. Масова частка вологи в готовому продукті не повинна перевищувати 5%.

Фасування та упакування функціонального харчового інгредієнту

2.2.17. Висушений порошок супернатанту на фасувально-упаковувальному автоматі фасують в ПЕТ флакони по 0,4 гр. Флакони упаковують в картонні коробки по 10 шт.

ТІ 24.14-02071062-003:2017

Транспортування і зберігання функціонального харчового інгредієнту

2.2.18. Транспортування та збереження функціонального харчового інгредієнту «Бігестім™» згідно з ГОСТ 17768-90.

2.2.19. Гарантований строк зберігання функціонального харчового інгредієнту «Бігестім™» не більше 12 місяців при температурі 4-6 °С.

3. ОПИС МЕТОДІВ І ЗАСОБІВ КОНТРОЛЮ ЗА ТЕХНОЛОГІЧНИМ ПРОЦЕСОМ

3.1. Контроль технологічного процесу:

Контроль температури здійснюють за допомогою термометрів ТГС-712 (межі вимірів яких становлять 0...150°C, клас точності 1). Контроль готової продукції проводять згідно вимогам ГФ XI, вип.2 і згідно з ОСТ 64-072-89.

4.ПРАВИЛА ПРИЙОМУ

4.1. Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім™» повинен прийматися партіями. Відбір і підготовка проб проводиться згідно з ГОСТ 15113.0, ГОСТ 26922, визначення органолептичних показників проводять згідно з ГОСТ 15113.3, ГОСТ 13586.2-81, масової частки вологи – згідно з ГОСТ 15113.4, ГОСТ 13586.5-85.

5. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

В 1 г функціонального харчового інгредієнту «Бігестім™» допускається наявність не більше 5×10^4 КМАФАнМ. Не допускається наявність плісневих грибів, дріжджів і бактерій групи кишкової палички.

Масову долю вологи визначають 1 раз в місяць.

ТІ 24.14-02071062-003:2017

Кожна партія функціонального харчового інгредієнту «Бігестім™» повинна бути перевірена відділом (лабораторією) технічного контролю підприємства і забезпечена посвідченням про якість із вказанням інформації, переліченої в ТУ.

5. ЗАСОБИ ВИМІРІВ

Термометр ТГС-712, межі вимірів 0-150°C, клас точності 1.

Ваги настільні РН-10Ц12У. Межі зважування 0,1-10,0 кг. Ціна поділу 5 г.

Погрішність: 100-2500 г – 0,5 г; 2500-10000 г – $\pm 1,0\%$.

Додаток Є

**Одеський національний
університет
імені І.І. Мечникова
Біологічний факультет**

Шампанський пров., 2,
Одеса, 65058,
Україна



**I.I. Mechnikov Odessa
National University
Biological Faculty**

2, Shampanskiy prov.,
Odesa, 65058,
Ukraine

Телефон: +(38) 0482 68 79 64; E-mail: bio@onu.edu.ua

ДОВІДКА

На базі віварію біологічного факультету Одеського національного університету імені І.І. Мечникова в період з 11.04.17 по 11.05.17 року проводили годування 5 груп безпорідних мишей (по 10 тварин у групі), відповідно до схеми експерименту, розробленої кафедрою біохімії, мікробіології і фізіології харчування Одеської національної академії харчових технологій (ОНАХТ). Контрольну групу підтримували на стандартному збалансованому раціоні віварію. Дослідні групи також знаходилися на стандартному раціоні харчування зі щоденним включенням синбіотичних БАД, які були розроблені нами. Протягом експерименту через кожні 10 діб відбирали проби фікалій тварин контрольної групи і дослідної групи, які піддавали мікробіологічному аналізу на кафедрі біохімії, мікробіології і фізіології харчування ОНАХТ.

Протягом 30-добового прийому першою групою тварин синбіотичного препарату «Біфідопропіонік», другою дослідною групою тварин – препарату «БПМ»; третьою дослідною групою тварин – препарат «Бігестім», загальний стан тварин залишався без змін, порівняно із контролем: миші добре поїдали корм, поведінка тварин була активною, рухливість не змінювалась.

Шерстяний покрив тварин був сухим, блискучим, видимі слизові – блідо-рожеві. В ході експерименту не було виявлено статистичного значущих змін маси тіла щурів дослідної групи у порівнянні із 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.

Видана для пред'явлення в Одеську національну академію харчових технологій.

Від ОНУ:

Декан біологічного факультету,
к.б.н., доцент



Зав. кафедрою мікробіології,
вірусології та біотехнології,
д.б.н., професор

Т. О. Філіпова

Зав. кафедрою фізіології людини
і тварин,
д.б.н., професор

О. А. Макаренко

Зав. віварієм

І. В. Родомакіна

Від ОНАХТ:

Зав. кафедрою біохімії,
мікробіології і фізіології
харчування,
д.т.н., професор

Л. В. Капрельянц

Інженер кафедри біохімії,
мікробіології і фізіології
харчування

Я. Б. Пауліна

Аспірант кафедри біохімії,
мікробіології і фізіології
харчування

Л. О. Крупицька

Додаток Ж

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор

з наукової роботи

Одеської національної академії

харчових технологій

Поварова Н. М.

« 07 »



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

ООО НПП «Аріадна»

65028, м. Одеса, вул. Моторна, 8А

Тяпкін А. М.

« 07 » 2017 р



АКТ

ПРОМислової АПРОБАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ
СИНБІОТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК
«БІФІПРОПІОНІК»

Ми представники науково-виробничого підприємства «АРІАДНА»

керівник виробництва Митник Д. А.;

начальник відділу управлінням якістю Чос О. С.

і

представники Одеської національної академії харчових технологій

завідувач кафедру біохімії, мікробіології та фізіології харчування

д.т.н., проф. Капрельянц Л. В.

аспірант кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування

Крупицька Л. О.

склали цей акт про те, що з 03.07.2017 по 10.07.2017 року на обладнанні підприємства була проведена промислова апробація технології виробництва синбіотичних біологічно активних добавок «Біфіпропіонік™» на основі про біотичних культур *B.longum*-ЯЗ, *P. shermanii*-4.

1. Підстави для проведення роботи.

Тимчасова технологічна карта на проведення дослідних робіт для виробництва синбіотичних біологічно активних добавок «Біфіпропіонік™»

2. Мета проведення досліджень.

2.1 Відпрацювання оптимальних режимів технологічних операцій, що складають процес виробництва синбіотичних біологічно активних добавок із заданими показниками.

2.2. Підтвердження можливості використання існуючого обладнання для даної технології

3. Призначення товару

Функціональний харчовий інгредієнт «Біфіпропіонік™» містить наступні пробіотичні культури: *B. longum*-ЯЗ, *P. shermanii*-4. У якості пребіотичного компоненту для створення синбіотичного продукту виступав синтезований пропіоновокислими бактеріями компонент, а саме 1,4-дігідроксі-2-нафтоїнова кислота. Функціональний харчовий інгредієнт характеризується вираженими пробіотичними, антагоністичними, антибіотичними властивостями. Забезпечує профілактику та усунення дисбактеріозу.

4. Норми витрати сировини на 1000г готової продукції:

Назва сировини	Функціональний харчовий інгредієнт
Сирна сироватка	45
Пептон ферментативний	2,0
Натрій оцтовокислий	1,2
Калій фосфорнокислий	0,4
Натрій фосфорнокислий	0,1
Аскорбінова кислота	0,01
Соєва сироватка	6,0
Вода	155,0
Склад захисного середовища	
Молоко	0,375
Желатин	0,375
Цукор	0,250
Вода	0,3

Необхідну сировину і реактиви для проведення апробації технології надала Крупицька Л. О.

5. Контроль технологічного процесу.

В процесі досліджень температуру контролювали термометром, рН вимірювали за допомогою рН-метру П-201 з електродом Інгольд. За органолептичними, фізики-хімічними і мікробіологічними показниками продукт відповідає прийнятим стандартам даного виду продукції.

Кількісний вміст мікроорганізмів в продукті не менше 10^{10} КУО/см³.

6. Висновки та рекомендації.

6.1. За результатами проведених досліджень було показано можливість отримання функціонального харчового інгредієнта, що містить пробіотичну культуру біфідо- та пропіоновокислих бактерій із заданими показниками якості в промислових умовах з використанням обладнання російсько-українського виробництва.

Відпрацьовані режими технологічних операцій, що складають : процес виробництва: рН середовища культивування 7,0; масова частка внесеного інокулята добової культури *B.longum*-ЯЗ, *P. shermanii*-4 – 5% у співвідношенні 1:1; температура культивування - 34 С, час культивування 24 години.

За результатами проведених досліджень отримано функціональний харчовий інгредієнт «БіфіпропіонікTM» у кількості 1000г, який передано Крупицькій Л. О. для подальших досліджень.

Від науково-виробничого підприємства «АРІАДНА»:

керівник виробництва

Митник Д. А.;

начальник відділу

управлінням якістю

Чос О. С.

Від Одеської національної академії харчових технологій

Зав. каф. біохімії, мікробіології

та фізіології харчування д.т.н., проф.

Капрельянц Л. В.

аспірант кафедри біохімії, мікробіології

та фізіології харчування

Крупицька Л. О.

Додаток 3

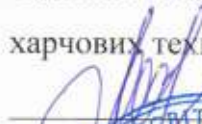
«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор

з наукової роботи

Одеської національної академії

харчових технологій

«Поварова Н. М.«2017р

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

ООО НПП «Аріадна»

65028, м. Одеса, вул. Моторна, 8А

«Тяпкін А. М.«2017р

АКТ

ПРОМИСЛОВОЇ АПРОБАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ХАРЧОВОГО ІНГРЕДІЄНТУ «БПМ»

Ми представники науково-виробничого підприємства «Аріадна»

керівник виробництва Митник Д. А.;

начальник відділу управлінням якістю Чос О. С.

і

представники Одеської національної академії харчових технологій

завідувач кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування

д.т.н., проф. Капрельянц Л.В.

аспірант кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування

Крупницька Л. О.

склали цей акт про те, що 03.07.2017 по 10.07.2017 року на обладнанні підприємства була проведена промислова апробація технології виробництва синбіотичних біологічно активних добавок «БПМ™» на основі культуральної рідини пробіотичних культур *B.longum*-ЯЗ, *P. shermanii*-4.

1. Підстави для проведення роботи.

Тимчасова технологічна карта на проведення дослідних робіт для виробництва синбіотичних біологічно активних добавок «БПМ™»

2. Мета проведення досліджень:

2.1 Відпрацювання оптимальних режимів технологічних операцій, що складають процес виробництва синбіотичних біологічно активних добавок із заданими показниками.

2.2. Підтвердження можливості використання існуючого обладнання для даної технології

3. Призначення товару

Функціональний харчовий інгредієнт «БПМ™» містить метаболіти *B.longum*-ЯЗ, *P. shermanii*-4. Функціональний харчовий інгредієнт характеризується вираженими пробіотичними, антагоністичними, антибіотичними властивостями. Забезпечує відновлення та підтримку балансу індигенної мікробіоти шлунково-кишкового тракту.

4. Норми витрати сировини на 1000мл готової продукції:

Назва сировини	Функціональний харчовий інгредієнт
Сирна сироватка	45
Пептон ферментативний	2,0
Натрій оцтовокислий	1,2
Калій фосфорнокислий	0,4
Натрій фосфорнокислий	0,1
Аскорбінова кислота	0,01
Соева сироватка	6,0
Вода	155,0

Необхідну сировину і реактиви для проведення апробації технології надала Крупицька Л.О.

5. Контроль технологічного процесу.

В процесі досліджень температуру контролювали термометром, рН вимірювали за допомогою рН-метру П-201 з електродом Інгольд. За органолептичними, фізики-хімічними і мікробіологічними показниками продукт відповідає прийнятим стандартам даного виду продукції.

Кількісний вміст мікроорганізмів в продукті відсутній.

Кількісний вміст 1,4-дигідрокси-2-нафтоїнової кислоти не менше 4,1 г/л

6. Висновки та рекомендації.

6.1. За результатами проведених досліджень було показано можливість отримання функціонального харчового інгредієнта що містить продукти метаболізму консорціуму культур біфідо- та пропіоновокислих бактерій із заданими показниками якості в промислових умовах з використанням обладнання російсько-українського виробництва.

Відпрацьовані режими технологічних операцій, що складають процес виробництва; рН середовища культивування 7,0; масова частка внесеного інокулята добової культури *B.longum*-ЯЗ, *P.shermanii*-4 – 5% у співвідношенні 1:1; температура культивування - 34 С, час культивування 24 години.

За результатами проведених досліджень отримано функціональний харчовий інгредієнт «БПМ™» у кількості 10л, який передано Круницькій Л. О. для подальших досліджень.

Від науково-виробничого підприємства «РІАДНА»:

керівник виробництва

Митник Д. А.;

начальник відділу

управління якістю

Чос О. С.

Від Одеської національної академії харчових технологій

Зав. каф. біохімії, мікробіології

та фізіології харчування д.т.н., проф.

Капрелянц Л. В.

аспірант кафедри біохімії, мікробіології

та фізіології харчування

Круницька Л. О.

Додаток И

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з наукової роботи
Одеської національної академії
харчових технологій

«» Товарова Н. М.

«» 2017р

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
ООО НПП «Аріадна»
65028, м. Одеса, вул. Моторна, 8А

«» Тяпкін А. М.

«» 2017р

АКТ

**ПРОМИСЛОВОЇ АПРОБАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ХАРЧОВОГО ІНГРЕДІЄНТУ «БІГЕСТІМ»**

Ми представники науково-виробничого підприємства «АРІАДНА»
керівник виробництва Митник Д. А.;
начальник відділу управлінням якістю Чос О. С.
і
представники Одеської національної академії харчових технологій
завідувач кафедрою біохімії, мікробіології та фізіології харчування
д.т.н., проф. Капрельянц Л. В.
аспірант кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування
Крупицька Л. О.,

склали цей акт про те, що з 03.07.2017 по 10.07.2017 року на обладнанні підприємства була проведена промислова апробація технології виробництва функціонального харчового інгредієнту «Бігестім™» на основі культуральної рідини пробіотичної культури *P. shermanii*-4.

1. Підстави для проведення роботи.

Тимчасова технологічна карта на проведення дослідних робіт для виробництва функціонального харчового інгредієнту «Бігестім™»

2. Мета проведення досліджень:

2.1 Відпрацювання оптимальних режимів технологічних операцій, що складають процес виробництва функціонального харчового інгредієнту із заданими показниками.

2.2. Підтвердження можливості використання існуючого обладнання для даної технології

3. Призначення товару

Функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім™» містить метаболіти *P. shermanii* - 4 і характеризується вираженими пробіотичними, антагоністичними, антибіотичними властивостями. Забезпечує відновлення та підтримку балансу індигеної мікробіоти шлунково-кишкового тракту.

4. Норми витрати сировини на 10000 мл готової продукції:

Назва сировини	Функціональний харчовий інгредієнт
Сирна сироватка	45
Пептон ферментативний	2,0
Натрій оцтовокислий	1,2
Калій фосфорнокислий	0,4
Натрій фосфорнокислий	0,1
Аскорбінова кислота	0,01
Соева сироватка	6,0
Вода	155,0

Необхідну сировину і реактиви для проведення апробації технології надала Крупицька Л. О.

5. Контроль технологічного процесу.

В процесі досліджень температуру контролювали термометром, рН вимірювали за допомогою рН-метру П-201 з електродом Інгольд. За органолептичними, фізики-хімічними і мікробіологічними показниками продукт відповідає прийнятим стандартам даного виду продукції.

Кількісний вміст мікроорганізмів в продукті відсутній.

Кількісний вміст 1,4-дигідрокси-2-нафтоїнової кислоти не менше 6,8 г/л

6. Висновки та рекомендації.

6.1. За результатами проведених досліджень було показано можливість отримання функціонального харчового інгредієнта що містить продукти метаболізму пропіоновокислих бактерій із заданими показниками якості в промислових умовах з використанням обладнання російсько-українського виробництва.

Відпрацьовані режими технологічних операцій, що складають процес виробництва: рН середовища культивування 7,0; масова частка внесеного

інокуляту добової культури *B.longum*-ЯЗ, *P.shermanii*-4 – 5% у співвідношенні 1:1; температура культивування - 34 °С, час культивування 24 години.

За результатами проведених досліджень отримано функціональний харчовий інгредієнт «Бігестім™» у кількості 10л, який передано Крупицькій Л. О. для подальших досліджень.

Від науково-виробничого підприємства «АРІАДНА»:

керівник виробництва

Митник Д. А.;

начальник відділу

управління якістю

Чос О. С.

Від Одеської національної академії харчових технологій

Зав. каф. біохімії, мікробіології

та фізіології харчування д.т.н., проф.

Капрельянц Л. В.

аспірант кафедри біохімії, мікробіології

та фізіології харчування

Крупицька Л. О.

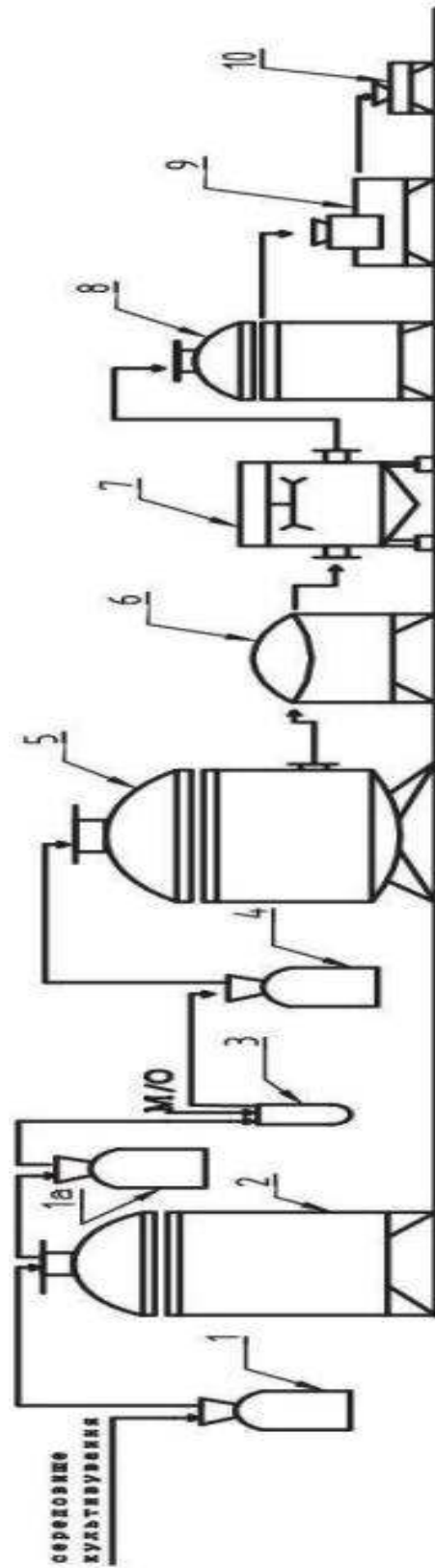


Рис. Апаратурна схема виробництва синбіотичних БАД

1. Не стерильне середовище культивування; 1а. Стерильне середовище культивування; 2. Автоклав; 3. Добова культура мікроорганізмів; 4. Посівна культура мікроорганізмів; 5. Ферментер; 6. Ліофільна сушка; 8. Розпушувач; 9. Прес; 10. Пакувальник.

Додаток І





ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA (11) 107738 (13) U
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2015 11451	(72) Винахідник(и):	Капрельянець Леонід Вікторович (UA), Труфкаті Людмила Вікторівна (UA), Крупницька Лариса Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	29.01.2018	(73) Власник(и):	ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої в чинності права на корисну модель:	24.08.2018		
(48) Публікація відомостей про видану патенту:	24.08.2018, Бюл. № 12		

(54) КОМПОЗИЦІЯ ІНГРЕДІЄНТІВ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *BIFIDOBACTERIUM*

(57) Реферат:

Композиція інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* містить лактозу, пептон, аскорбінову кислоту, натрій лимоннокислий тризаміщений, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий, агар-агар, дистильовану воду, стимулятор росту. При цьому як стимулятор росту вона містить соєву сироватку.

UA 107738 U

Додаток Й

Протягом останніх десяти років поширення біологічно активних добавок (БАД) на ринку України сформувався досить високий інтерес до цієї продукції, як з боку виробників, так і споживачів.

За даними аудиту фармацевтичного ринку України за 2016 рік через аптечну мережу було реалізовано 268 млн. Упаковок БАД на суму 31,5 млрд. гривень (в цінах закупівлі аптек).

Для аптеки біологічно активні добавки залишаються найбільш важливою категорією аптечного нелікарського асортименту, що складав 4% від загального обсягу продажів. За 2016 рік на полицях було представлено близько 2450 різних брендів БАД, які виробляють близько 950 виробників.

Ринок БАД у гривнях ще 2 роки тому ріс досить високими темпами: в середньому на 12-14% на рік. У 2015 році позитивна динаміка зростання збереглася, але темпи зростання знизилися, що є наслідком кризових явищ. За даними за 2015 рік обсяг продажів БАД в аптеках зріс лише на 6%

Фахівцями компанії DSM був створений свій класифікатор БАД, який найбільш чітко відображає реалії сучасного ринку БАД. Класифікатор БАД складається з 17-ти розділів, більшість з яких має 2-й підрівень, а деякі розділи - 3-й. Як і в минулі періоди, найбільш затребуваними залишаються V БАД, що діють на організм в цілому. У порівнянні з 2015 роком в 2016 році дана група БАД вросла на 8% у гривнях

Група А БАД, що діють на травлення показала максимальний приріст обсягів у грошовому вираженні (+ 17%) і піднялася на одну сходинку вгору в 2017 році.

Після аналізу ринку БАД, можна зробити висновок, про те, що розроблені нами продукти будуть затребувані на ринку. Тому доцільним є розрахувати ефективність впровадження результатів наукового дослідження у виробництво.

**Вартість сировини і основних матеріалів для отримання БАД
«Біфіпропіоник™», «БПМ™» та «Бігестім™»**

Назва сировини	Одиниця виміру	Кількість одиниць в 1 кг	Ціна Одиниці, кг/грн	Вартість продукту, грн
Склад середовища кльтивування				
Сирна сироватка	л	45	7,50	1125
Пептон ферментативний	кг	2,0	147,0	639,4
Натрій оцтовокислий	кг	1,2	113,85	676,2
Калій фосфорнокислий	кг	0,4	78,0	314,2
Натрій фосфорнокислий	кг	0,1	33,0	7,59
Аскорбінова кислота	кг	0,01	1716,25	39,5
Соєва сироватка	л	6,0	945,0	13041
Вода	л	200,0	0,8	368
Склад захисного середовища				
Молоко	л	0,375	14,34	12,3
Желатин	кг	0,375	239,3	205,8
Цукор	кг	0,250	13,49	7,8
Вода	л	0,3	0,8	0,55
Всього				16509,1

Вартість допоміжних матеріалів для виробництва препаратів «Біфіпропіоник», «БПМ» та «Бігестім» представлені в таблиці 2.

Вартість допоміжних матеріалів для виробництва БАД

Назва сировини	Одиниця виміру	Кількість одиниць в 1 кг	Ціна Одиниці, кг/грн	Вартість Одиниці, грн
Миючий засіб	кг	0,2	14	1120
Дезинфікуючий засіб	кг	0,2	128	10240
Пластикові флакони	шт	10	1,4	4800
Коробки картонові для фасування	шт	10	0,2	800
Етикетки	шт	10	0,4	1600
Коробки картонові	шт	2	4,5	360
Всього				18920

2. Розрахунок інвестицій у виробництво

1. Придбання результатів наукових досліджень = 66000 грн.

2. Підготовка та проведення державної реєстрації сертифікації функціональних інгредієнтів = 10000 грн.

3. проведення досліджень ринку і розробка заходів щодо організації збуту функціональних інгредієнтів = 6700 грн.

Придбання спеціального обладнання для виробництва, в тому числі монтажних і спуско-налагоджувальних робт = 200316 грн

**Сметно-фінансовий розрахунок вартості впроваджувального
обладнання**

№	Найменування обладнання	Кількість, шт	Балансова вартість 1шт/грн
1	Ваги	1	1050
2	Електрична плита	1	371
3	Холодильник	1	5671
4	Центрифуга	1	29590
5	Автоклав	1	65000
6	Сухожарова шафа	1	10230
7	Ферментер промисловий	1	20800
8	Мікроскоп	1	8900
9	Спиртівка	1	29
10	Ємність для сирту	1	53
11	Ємність для гідроксиду натрію	1	32
12	Ємність для сипучих продуктів	4	29
13	Чашки Петрі	10	31
14	Пробірки	30	12
15	Піпетки	30	9
16	Дозатор	1	310
17	Накінецьники для дозаторів	1	125
18	Колби	3	20
19	Мірний стакан	1	50
20	Мірний циліндр	1	70
21	Лійка	1	30
22	Скельця	10	3
23	Напівавтоматична лічильно-Розливна машина	1	32000
24	Монтажні і спуско-налагоджувальні роботи		24799
	Всього		200316

Всього інвестицій в основному капіталі складають:

$$6600+10000+6700+200316= 22316$$

Середня оборотність оборотного капіталу в мікробіологічному виробництві складає, приблизно, чотири обороти в рік. Таким чином інвестиції в оборотному капіталі повинні складатися вартість матеріальних затрат за 3 місяці. Матеріальні затрати на виробництво функціональних інгредієнтів за 3 місяці складають 418405,3 грн.

Всього інвестицій = 642021.3. Інвестиціями є своїкошти 418405.3 грн і кредит банку 223616 грн на 3 роки.

Продуктивність обладнання дозволяє отримати 20 літрів препаратів «Біфіпропіонік», «БПМ» та «Бігестім» за добу.

Підприємство працює в одну зміну 5 робочий днів в тиждень. Число робітників, які обслуговують обладнання складає 8 чоловік в зміну. Всього 13 чоловік.

Калькуляція собівартості БАД «Біфіпропіонік™»

Назва сировини	Одиниця виміру	Кількість одиниць в 1 кг	В місяць 460 л (2,3кг)	Ціна Одиниці, кг/грн	Вартість продукту, грн
1	2	3	4	5	6
Сирна сироватка	л	200,0	460	7,50	1125
Пептон ферментативний	кг	2,0	46	147,0	639,4
Натрій оцтовокислий	кг	1,2	2,76	113,85	676,2
Калій фосфорнокислий	кг	0,4	0,92	78,0	314,2
Натрій фосфорнокислий	кг	0,1	0,23	33,0	7,59
Аскорбінова кислота	кг	0,01	0,023	1716,25	39,5
Соєва сироватка	л	6,0	13,8	945,0	13041
Вода	л	200,0	460	0,8	368
Склад захисного середовища					
Молоко	л	0,375	0,86	14,34	12,3

1	2	3	4	5	6
Желатин	кг	0,375	0,86	239,3	205,8
Цукор	кг	0,250	0,58	13,49	7,8
Вода	л	0,3	0,69	0,8	0,55
Всього					16509,1
Миючий засіб	кг	0,2	80	14	1120
Дезинфікуючий засіб	кг	0,2	80	128	10240
Пластикові флакони	шт	10	4000	1,4	4800
Коробки картонові для фасування	шт	10	4000	0,2	800
Етикетки	шт	10	4400	0,4	1600
Коробки картонові	шт	2	80	4,5	360
Всього			0,8		18920
Енергоресурси					3910
Заробітна плата виробничих робітників					30000
Відрахування від з/п				37,58	9770,8
Амортизація обладнання					1704,9
Амортизація НМА					366,7
Втрати від браку				0,4 %	631,64
Інші виробничі витрати				5 %	10960,72
Виробнича собівартість					92773.86
Комерційні витрати				18%	7284
% по банківському кредиту				25%	17280,7
Повна собівартість					118338.56
Вартість 1 флакону (0,6г)					30,87
Рентабельність 15%					5,21

1	2	3	4	5	6
Ціна					36,08
Ціна з НДС					50,73

Прибуток за рік = $(36,08 - 30,87) \cdot 12 \cdot 2448 = 183012,48$ грн.

Таблиця 4.7.

Вартість сировини і основних матеріалів для отримання

«БПМ™» та «Бігестім™»

Назва сировини	Одиниця виміру	Кількість одиниць в 1 кг	В місяць 460 л (2,3кг)	Ціна Одиниці, кг/грн	Вартість продукту, грн
1	2	3	4	5	6
Супернатант	л	200,0	460	0	0
Молоко	л	0,375	0,86	14,34	12,3
Желатин	кг	0,375	0,86	239,3	205,8
Цукор	кг	0,250	0,58	13,49	7,8
Вода	л	0,3	0,69	0,8	0,55
Всього					226,45
Миючий засіб	кг	0,2	80	14	1120
Дезинфікуючий засіб	кг	0,2	80	128	10240
Пластикові флакони	шт	10	4000	1,4	4800
Коробки картонові для фасування	шт	10	4000	0,2	800
Етикетки	шт	10	4400	0,4	1600
Коробки картонові	шт	2	80	4,5	360
Всього			0,8		18920
Енергоресурси					21210
Заробітна плата виробничих робітників					30000

1	2	3	4	5	6
Відрахування від з/п				37,58	9770,8
Амортизація обладнання					1704,9
Амортизація НМА					266,7
Втрати від браку				0,4 %	631,64
Інші виробничі витрати				5 %	10150,27
Виробнича собівартість					65880,76
Комерційні витрати				18%	7284
% по банківському кредиту				25%	17280,7
Повна собівартість					118338.56
Вартість 1 флакону (0,6г)					10,87
Рентабельність 15%					5,21
Ціна					16,08
Ціна з НДС					30,73

Прибуток за рік = $(16,08 - 10,87) \cdot 12 \cdot 2448 = 183012,48$ грн

Всього прибуток: $183012,48 + 183012,48 + 183012,48 = 549037,44$ грн.

Чистий прибуток $549037,44 - 549037,44 \cdot 0,23 = 296480,22$ грн.

23 % – ставка податку на прибуток

Строк окупаемости проекта = $\frac{642021,3}{296480,22} = 2,2 \approx 2$ роки 2 місяці

Підприємство працює в одну зміну 5 робочий днів в тиждень. Число робітників, які обслуговують обладнання складає 8 чоловік в зміну. Всього 13 чоловік. Продуктивність обладнання дозволяє отримати 20 літрів заявлених препаратів.

ДОДАТОК К

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

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. Krupytska et all // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2017. №. 3 (6). С. 15-20.

4. Krupytska 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., Крупицкая Л.А. Пробиотические свойства и биохимический потенциал пропионовокислых 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 пропіоновокислих 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 пропіоновокислих бактерій](#) // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. №. 73. С. 143-149.

9. Капрельянц Л.В., Труфкати Л.В., Крупицкая 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 C12N 1/20 / Капрельянц Л.В., Труфкаті Л.В., Крупицька Л.О.; власник ОНАХТ № u 2015 11451; заявл. 29.01.2016; опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12.

4. Матеріали конференцій

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

12. Капрельянц Л.В., Крупицкая Л.О. Пробиотичних комплекс з пропіоновокислими 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., Труфкаті В.Л. Оптимізація параметрів сумісного культивування *Bifidobacterium longum* - 1 та *Propionibacterium shermanii* - 4. // Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности: 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., Труфкаті 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.