

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

ЗИКОВА НАТАЛІЯ СЕРГІЇВНА

УДК [579.864:579.873.1]:615.331:546.33'23

**БІОТЕХНОЛОГІЯ СЕЛЕНВМІСНИХ
ПРОБІОТИКІВ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса – 2017

Дисертацією є рукопис
Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій
Міністерства освіти і науки України

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

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

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

Захист відбудеться **01 грудня 2017 року о 14.30** на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.02 Одеської національної академії харчових технологій (65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської національної академії харчових технологій (м. Одеса, вул. Канатна, 112), ауд. А234

Автореферат розісланий „___” _____ 2017 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Г.В. Крусір

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В останні роки в багатьох країнах світу, зокрема в Україні, проводяться дослідження, спрямовані на створення нових продуктів харчування функціонального призначення. Селен є незамінним мікроелементом, недостатність якого в харчуванні може впливати на виникнення низки захворювань. Найбільше визнання отримали харчові добавки на основі органічних сполук селену, в яких цей елемент є більш небезпечним і біодоступним, ніж неорганічні його форми. Важливим напрямом таких досліджень є розробка біотехнології селенвмісних пробіотиків, які поєднують позитивні властивості пробіотичних мікроорганізмів та органічної форми селену.

Селенвмісні пробіотичні мікроорганізми лакто- і біфідобактерії здатні накопичувати мікроелемент в дуже високих концентраціях і характеризуються низкою позитивних ефектів для людини. Селен, що знаходиться в мікроорганізмах в органічній формі, добре засвоюється, має високу антиоксидантну і антимутагенну властивості, сприяє виводу з організму іонів важких металів. Пробіотичні культури лакто- та біфідобактерій, в свою чергу, забезпечують неспецифічну резистентність організму за рахунок мікробного антагонізму, активацію фагоцитарної і цитостатичної активностей макрофагів, виділяють антибіотичні сполуки, вітаміни та інші біологічно активні речовини.

Перспективним біотехнологічним шляхом є отримання харчових джерел цього есенціального мікроелементу у вигляді наноселену, через встроювання селену в біоматриці лакто- і біфідобактерій. Основна перевага наноселену порівнянно з іншими формами – більш низька токсичність, вища біологічна активність, краще накопичення в тканинах організму.

Таким чином, розробка біотехнології селенвмісних пробіотиків нового покоління та наноформ селену є актуальним завданням. Дисертаційна робота присвячена розробці біотехнології отримання селенвмісних дієтичних добавок та функціональних харчових продуктів з їх включенням. Важливе місце займає дослідження процесу біотрансформації неорганічних форм селену пробіотичними мікроорганізмами в органічну форму (селеноцистеїн, селенометионін) та наноселен.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає тематиці досліджень проблемної науково-дослідної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій № 1/15 П «Науково-технічні основи біотехнологій функціональних інгредієнтів та продуктів на основі полісахаридів».

Мета за завдання дослідження. Метою роботи є розробка біотехнологій селенвмісних пробіотиків, дієтичних добавок та отримання харчових продуктів з їх включенням.

Для поставленої мети були визначені основні завдання досліджень:

- вибір культур мікроорганізмів – біоматриць для встроювання селену;

- підбір раціональних середовищ культивування для обраних мікроорганізмів;
- підбір препаратів неорганічного селену;
- дослідження кінетичних показників росту мікроорганізмів і накопичення органічних форм селену мікроорганізмами-пробіотиками;
- дослідження основних мікробіологічних та фізико-хімічних показників отриманих продуктів;
- визначення якісних змін отриманих продуктів в процесі їх зберігання;
- розробка технологічних схем отримання селензбагачених пробіотиків та продуктів і проведення промислової апробації;
- розробка нормативної документації з отримання продуктів та розрахунок собівартості та економічної ефективності розробленої технології, проведення медико-біологічних досліджень.

Об'єкт дослідження – харчова біотехнологія, пробіотики, дієтичні добавки, функціональні харчові продукти.

Предмет дослідження – селенвмісні пробіотичні мікроорганізми та наноселен.

Методи дослідження – комплекс традиційних і сучасних мікробіологічних, біохімічних, фізико-хімічних, технологічних методів з використанням сучасного обладнання та комп'ютерних технологій.

Наукова новизна одержаних результатів. Досліджені кінетичні характеристики культивування пробіотичних мікроорганізмів. Проведена оптимізація процесу культивування мікроорганізмів на селенвмісних середовищах. Вперше виділено та очищено препарат наноселену. Проведена медико-біологічна оцінка якості отриманих продуктів. Теоретично обґрунтовано основні етапи досліджень і послідовність технологічних операцій отримання селензбагачених пробіотиків. Розроблена комплексна біотехнологія отримання селензбагачених функціональних інгредієнтів. Наукова новизна роботи декларативним патентом України на корисну модель № 111251 «Спосіб одержання пробіотичної селеновмісної добавки».

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено науково обґрунтовані принципи і апаратурні технологічні схеми одержання селенвмісних дієтичних добавок «Селенолакт», «Біфісел», «Селенобіфілакт», «Наноселеніум». На підставі одержаних даних розроблено нормативну документацію виробництва дієтичних добавок. Розроблену технологію апробовано на підприємстві ООО НПО «Аріадна», проведені медико-біологічні дослідження.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою роботою автора. Експериментальна робота виконана особисто автором. Розроблені наукові основи отримання функціональних інгредієнтів на основі селензбагачених пробіотиків. Проведено аналіз літературних та патентних даних, проаналізовані та узагальнені отримані результати, підготовлені матеріали досліджень у вигляді статей, патентів, тез, розроблена нормативна документація, проведена

промислова апробація розробленої технології. Особистий вклад здобувача підтверджується представленими документами і науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень доповідались на 8 наукових конференціях, а саме: міжнародній науковій конференції «Нові ідеї в харчовій науці – нові продукти харчової промисловості» (з нагоди 130-ти річчя НУХТ; Київ, 2014); IV міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 2014); 75 наукову конференцію науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2015); міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Харчові продукти та біотехнологія: сучасний стан і перспективи розвитку» (Полтава, 2015); 81 міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ, 2015); 76 наукову конференцію науково-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2016); III міжнародна науково-практична конференція «Інтеграційна система освіти, науки і виробництва в сучасному інформаційному просторі» (Тернопіль, 2016); IX міжнародна виставка LABComplex, науково-практичний семінар «Біотехнології в харчовій промисловості».

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано у 13 наукових робіт, із них 5 – у фахових виданнях України, один патент України на корисну модель, 2 – у наукових журналах, тези 5 доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку літератури і додатків. Зміст роботи викладено на 165 сторінках, включаючи 33 таблиці (на 17 стор.), 72 рисунки (на 18 стор.), 17 додатків (на 152 стор.). Список використаних бібліографічних джерел містить 219 найменувань (на 23 стор.)

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми досліджень, визначено наукову новизну, практичне значення одержаних результатів, сформульовано загальну мету, відображено їхню апробація та особистий внесок здобувача, подано відомості про публікації автора.

У **першому розділі** на базі аналізу літературних джерел дана характеристика асортименту продуктів функціонального призначення ринку України. Наведена загальна характеристика мікроелементу селену, охарактеризовано значення та основні функції селену в організмі людини. До них відносять: антиканцерогенну, антимуtagenну, антиоксидантну властивості. Виявлено, що основними структурами, в які включається селен, це білки та ферменти. Визначено основні форми надходження мікроелементу до організму, якими є: селен органічний натуральний; селен органічний штучний; селен органічний, отриманий біотрансформацією в мікроорганізмах; селен мінеральний. Описано процес перетворень (біохімічного маршруту) селену в організмі людини.

Дана загальна характеристика пробіотиків на прикладі пробіотичних культур лакто- та біфідобактерій, описано їх вплив на організм людини. Охарактеризовано здатність мікроорганізмів до акумуляції та біотрансформації

селену. Представлено загальну схему перетворень неорганічних форм селену (селеніту та селенату натрію), за допомогою мікроорганізмів, в органічні (селен метіонін та селеноцистеїн) та наноселен. Наведено характеристику наноструктур селену, як біоактивних компонентів їжі.

У другому розділі викладено відомості про об'єкти і методи досліджень. Подано програму досліджень, що відображає основні напрямки досліджень та взаємозв'язок етапів вирішення поставлених завдань (рис. 1).

Основна частина досліджень була проведена в лабораторіях кафедри біохімії і мікробіології ОНАХТ, окремі дослідження виконувалися на кафедрі процесів, обладнання та енергетичного менеджменту ОНАХТ; на базі Фізико-хімічного інституту імені А. В. Богатського НАН України, та в Одеському селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннєзнавства та сортовивчення.

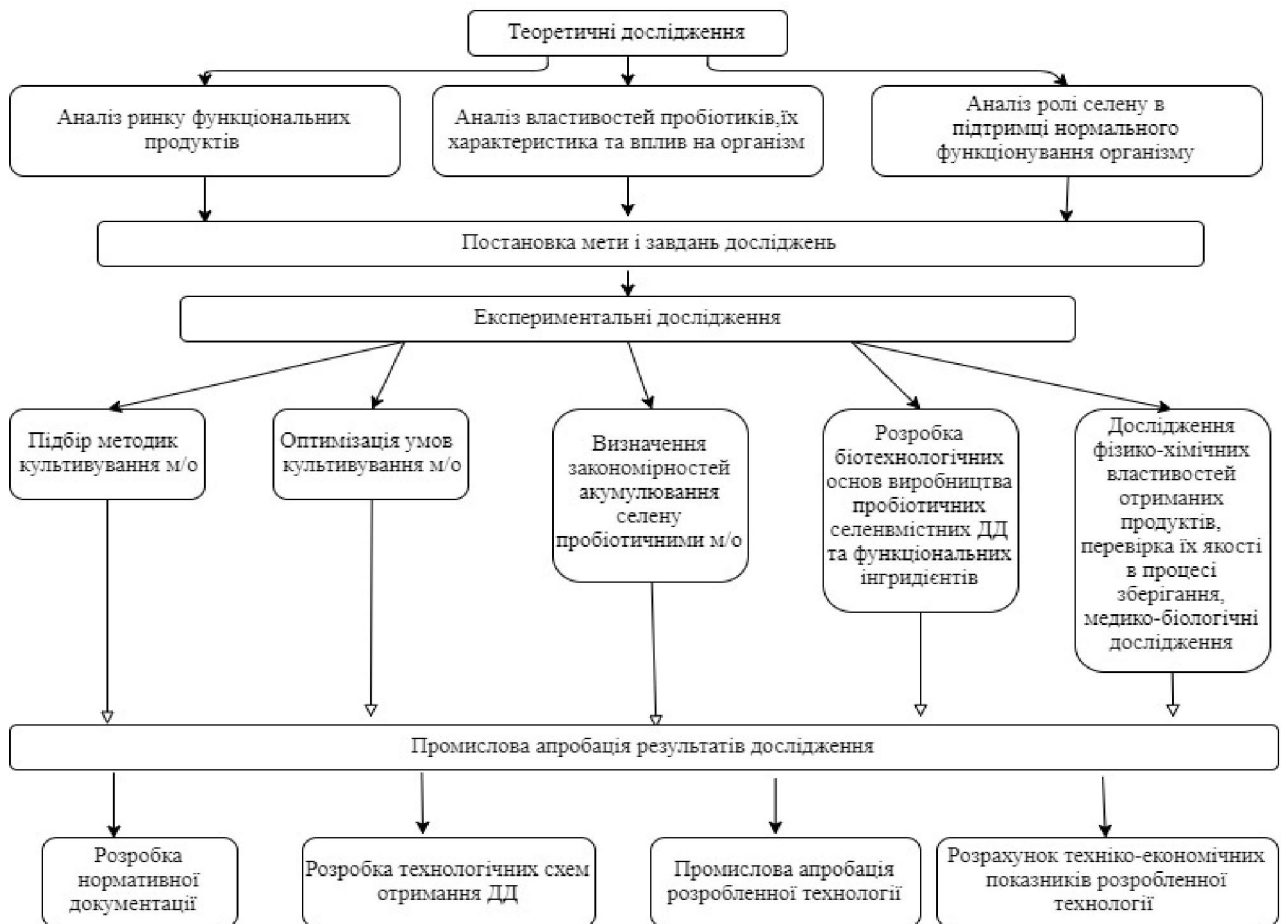


Рис.1. Програма досліджень.

Об'єктами досліджень у даній дисертаційній роботі були: пробіотичні культури *Lactobacillus acidophilus* штам 412/307 із музею кафедри біохімії, мікробіології і фізіології харчування ОНАХТ та *Bifidobacterium bifidum I* □ препарат «Біфідумбактерин», виготовлений компанією «Біофарма». В якості джерела селену використовували селеніт натрію Na_2SeO_3 (ТОВ НВП Хемел, хч). Середовищами для культивування лактобактерій було обрано MRS бульйон (протеозопептон; м'ясний екстракт; глюкоза; дріжджовий екстракт;

Твін-80; ацетат натрію; цитрат амонію) та середовище на основі сирної сироватки (сирна сироватка; молоко; нартій оцтовокислий; сульфат магнію; кукурудзяний екстракт), для культивування біфідобактерій обрали кукурудзяно-лактозне середовище (лактоза; пептон; цитрат натрію; калій; натрій фосфорнокислий; аскорбінова кислота; кукурудзяний екстракт; вода).

Зразки культур (суха біомаса досліджуваних мікроорганізмів) масою 50 мг розводили в 1 мл рідкого середовища культивування, далі по 500 мкл розведених культур засівали в 9,5 мл середовища. Проби інкубували в термостаті протягом 24 годин, при 37 °С. Отримані культури в тому ж об'ємі засівали в середовища для посівного матеріалу та інкубували при вище згаданих умовах. Після досягнення максимального накопичення клітин та ідентифікації по культуральним, морфологічним та біохімічним властивостям отримані культури мікроорганізмів використовували в якості посівного матеріалу.

У третьому розділі наведено результати експериментальних досліджень, пов'язаних з одержанням селенвмісних пробіотиків і наноструктур селену.

Проведено підбір оптимального джерела неорганічної форми селену, для акумуляції культурами лакто- та біфідобактерій. В якості обраних джерел селену використовували селеніт натрію \square Na_2SeO_3 , селенисту кислоту – H_2SeO_4 , селенат натрію \square Na_2SeO_4 , які додавали в середовища культивування в кількості 5 мкг/см³. Встановлено, що найкраще акумулюється та біотрансформується досліджуваними мікроорганізмами селеніт натрію. Кількість селену в отриманій селенвмісній біомасі лактобактерій становила 370 мкг, а в селеновмісній культурі біфідобактерій – 355 мкг. В подальшій роботі Na_2SeO_3 додавали в середовища культивування мікроорганізмів в кількості рівній, мкг/см³: 0,5; 1; 2; 3; 5; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 відповідно.

За показниками оптичної густини (ОГ), КУО/см³, питомої швидкості росту (ПШР), тривалості генерації (ТГ), активної (рН) та титрованої кислотності (°Т) вивчено вплив концентрацій Na_2SeO_3 на динаміку накопичення культур лакто- та біфідобактерій. Вище згадані показники стали основою для вивчення динаміки накопичення селенвмісної біомаси лактобактерій на MRS середовищі та середовищі із сирної сироватки. Важливим завданням було порівняння приросту біомаси мікроорганізмів на двох вище згаданих середовищах культивування.

На рис. 1,2 відображено вплив зростаючих концентрацій Na_2SeO_3 на зміну показників оптичної густини та колоніє утворюючих одиниць, в процесі накопичення біомаси лактобактерій на MRS середовищі.

Показники оптичної густини в процесі культивування лактобактерій на середовищі із вмістом селену 0,5–5 мкг/см³ були на рівні з контролем. При концентраціях селену 8–20 мкг/см³ динаміка накопичення біомаси поступово знижувалась. Показники КУО/см³ свідчать про пригнічуючий вплив зростаючих концентрацій Na_2SeO_3 на динаміку накопичення мікроорганізмів на всіх етапах культивування. В кінці культивування кількість лактобактерій в контролі та при концентраціях 0,5–5 мкг/см³ була на рівні 5×10^9 КУО/см³, а при вмісті селеніту натрію – 20 мкг/см³ – 7×10^8 КУО/см³.

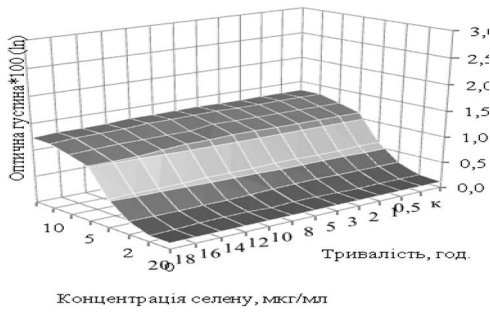


Рис. 1. Динаміка росту лактобактерій на живильному середовищі MRS за показниками ОГ.

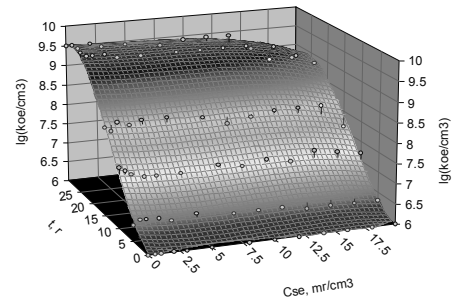


Рис. 2. Динаміка росту лактобактерій на живильному середовищі MRS за показниками КУО/см³.

За показниками ОГ визначали зміну показників ПШР та ТГ, в процесі культивування лактобактерій. Показники ПШР та ТГ, при культивуванні лактобактерій на MRS середовищі відображено в таблиці 1. Встановлено, що на всіх етапах культивування зі зростанням концентрації Na_2SeO_3 до 8–20 мкг/см^3 пригнічувався процес накопичення біомаси лактобактерій, що відображено в затримці ПШР та зниженні значень ТГ. Це пов'язано з накопиченням надмірної кількості селеноводню в бактеріальних клітинах, котрий є досить токсичним для клітин.

Таблиця 1

Зміна показників питомої швидкості росту та тривалості генерації в процесі культивування мікроорганізмів на MRS середовищі

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

Кількість селеніту натрію, мкг/см^3	Тривалість культивування, год							
	0-5 год	0-10 год	0-15 год	0-24 год	0-5 год	0-10 год	0-15 год	0-24 год
	Питома швидкість росту, год^{-1}				Тривалість генерації			
0	0,35	0,20	0,132	0,079	1,98	3,50	5,20	8,7
0,5	0,35	0,20	0,132	0,079	1,98	3,50	5,20	8,7
1	0,35	0,20	0,132	0,079	1,98	3,50	5,20	8,70
2	0,36	0,20	0,130	0,079	1,92	3,50	5,30	8,70
3	0,36	0,21	0,139	0,084	1,92	3,30	4,90	8,20
5	0,35	0,18	0,119	0,072	1,98	3,85	5,70	9,50
8	0,34	0,18	0,116	0,070	2,03	3,85	5,90	9,80
10	0,33	0,17	0,110	0,067	2,10	4,0	6,20	10,2
12	0,32	0,17	0,10	0,066	2,15	4,0	6,90	10,4
14	0,32	0,16	0,10	0,066	2,15	4,30	6,90	10,4
16	0,31	0,16	0,10	0,065	2,20	4,30	6,90	10,6
18	0,31	0,16	0,10	0,064	2,20	4,30	6,90	10,7
20	0,31	0,16	0,10	0,064	2,20	4,30	6,90	10,7

Відмічено затримку в кислотоутворенні, досліджуваними культурами мікроорганізмів, у зразках із вмістом Na_2SeO_3 – 8–20 $\text{мкг}/\text{см}^3$. Значення активної кислотності вкінці культивування (у зразках із вмістом Na_2SeO_3 0–8 $\text{мкг}/\text{см}^3$) становили 4,3, а титрованої – 112°Т. Значення активної кислотності (у зразках із вмістом Na_2SeO_3 10–20 $\text{мкг}/\text{см}^3$) становили 4,44, а титрованої – 109°Т.

Зміна показників ОГ та КУО/ см^3 , в процесі культивування лактобактерій на середовищі із сирної сироватки відображена на рис. 3,4. Встановлено, поступову затримку динаміки накопичення мікроорганізмів (за показниками ОГ та КУО/ см^3), порівняно з контролем, при концентраціях Na_2SeO_3 рівних 10–20 $\text{мкг}/\text{см}^3$.

Так, в кінці культивування в контролі значення ОГ досягнули 2,18 од, а в зразку із максимальною концентрацією Na_2SeO_3 – 2,09 од. Максимального значення показники колоніє утворюючих одиниць досягнули на 24 годину культивування і становили 10^9 КУО/ см^3 , при концентрації селеніту натрію рівній 0,5–16 $\text{мкг}/\text{см}^3$. Дещо менші показники, а саме 10^8 КУО/ см^3 , було зафіксовано у зразках із вмістом селеніту натрію 18–20 $\text{мкг}/\text{см}^3$. За показниками ОГ визначали показники тривалості генерації та питому швидкість росту мікроорганізмів.

Визначено, що на всіх етапах культивування значення показників ПШР затримувались, а значення ТГ зростали зі зростанням концентрацій Na_2SeO_3 до 8–20 $\text{мкг}/\text{см}^3$ (порівняно із контролем). Це пояснюється відсутністю у мікроорганізмів механізму регуляції надходження селену.

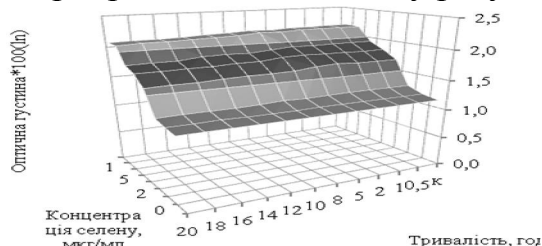


Рис. 3. Динаміка росту лактобактерій на середовищі із сирної сироватки за показниками ОГ.

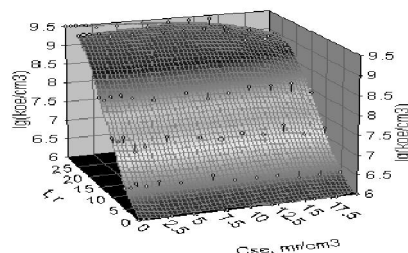


Рис. 4. Динаміка росту лактобактерій на середовищі із сирної сироватки за показниками КУО/ см^3 .

Тобто, чим вища концентрація мікроелементу в середовищі культивування, тим більша його кількість акумулюється клітинами мікроорганізмів, що негативно впливає на протікання в них біохімічних процесів. Показники активної та титрованої кислотності, протягом всього процесу культивування мікроорганізмів, свідчили про затримку кислотоутворення зі зростанням вмісту Na_2SeO_3 в середовищі в кількості 8–20 $\text{мкг}/\text{см}^3$. Так, в контролі, на 24 годину культивування, значення рН становили 4,36, а у пробі із максимальним вмістом селеніту натрію – 4,49. Показники титрованої кислотності в контролі, на 24 годину культивування, становили 108 °Т, в пробі із 20 $\text{мкг}/\text{см}^3$ селеніту натрію – 102 °Т.

Зміна показників питомої швидкості росту та тривалості генерації в процесі культивування мікроорганізмів на середовищі із сирної сироватки (n=3, P≥0,95)

Кількість селеніту натрію, мкг/см ³	Тривалість культивування, год							
	0-5 год	0-10 год	0-15 год	0-24 год	0-5 год	0-10 год	0-15 год	0-24 год
	Питома швидкість росту, год ⁻¹				Тривалість генерації			
0	0,30	0,16	0,10	0,06	2,30	4,30	6,90	11,1
0,5	0,30	0,16	0,10	0,06	2,30	4,30	6,90	11,1
1	0,30	0,16	0,10	0,06	2,30	4,30	6,90	11,1
2	0,30	0,16	0,10	0,06	2,30	4,30	6,90	11,1
3	0,31	0,16	0,10	0,06	2,20	4,30	6,90	10,9
5	0,27	0,16	0,10	0,06	2,50	4,30	6,90	10,9
8	0,27	0,14	0,09	0,05	2,50	4,95	7,50	13,2
10	0,7	0,14	0,09	0,05	2,50	4,95	7,50	12,5
12	0,27	0,14	0,09	0,05	2,50	4,95	7,50	12,5
14	0,27	0,13	0,09	0,05	2,50	5,30	7,50	12,7
16	0,27	0,13	0,09	0,05	2,50	5,30	7,60	12,7
18	0,27	0,13	0,08	0,05	2,50	5,30	7,70	12,7
20	0,27	0,13	0,08	0,05	2,50	5,30	7,70	13,0

Таким чином, порівнюючи дані показників ОГ, КУО/см³, ПШР та ТГ, отримані в процесі культивування лактобактерій на MRS бульйоні та середовищі із сирної сироватки, можна зробити висновок про однаково інтенсивний приріст біомаси мікроорганізмів, що дало можливість використовувати середовище із сирної сироватки як середовище накопичення селеновмісної біомаси, на подальших етапах культивування лактобактерій. Оптимальними концентраціями джерела селену, котрі б не викликали сповільнення динаміки накопичення біомаси лактобактерій, були 0,5–5 мкг/см³.

Динаміка накопичення біомаси біфідобактерій на кукурудзяно-лактозному середовищі представлена на рис. 5,6. Визначено, що біфідобактерії є більш чутливими до високих концентрацій Na₂SeO₃ в середовищі культивування із підвищеним вмістом селеніту натрію. Оптимальними концентраціями Na₂SeO₃, котрі не викликають пригнічення в процесі накопичення біфідобактерій є 0,5–3 мкг/см³. З підвищенням концентрації селеніту натрію показники ОГ та КУО/см³ інтенсивно знижувались, порівняно з контролем.

Наступним завданням було визначення зміни показників ПШР та ТГ, в процесі культивування біфідобактерій.

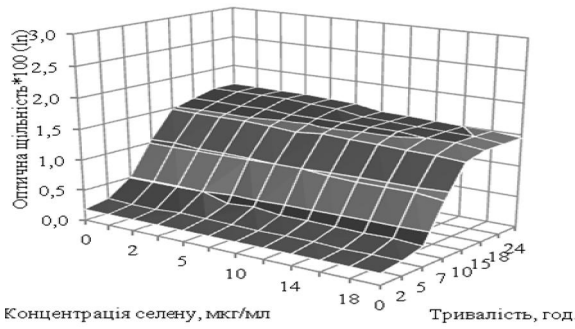


Рис. 5. Динаміка росту біфідобактерій на кукурудзяно-лактозному середовищі за показниками ОГ.

Визначено, що концентрації Na_2SeO_3 від 8 до 20 мкг/см^3 затримують ПШР та зменшують ТГ на всіх етапах культивування.

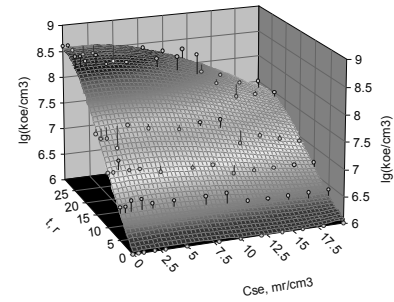


Рис. 6. Динаміка росту біфідобактерій на кукурудзяно-лактозному середовищі за показниками КУО/см³.

Таблиця 3

Зміна показників питомої швидкості росту та тривалості генерації в процесі культивування мікроорганізмів на кукурудзяно-лактозному середовищі

(n=3, P≥0,95)

Кількість селеніту натрію, мкг/см^3	Тривалість культивування, год							
	0-5 год	0-10 год	0-15 год	0-24 год	0-5 год	0-10 год	0-15 год	0-24 год
	Питома швидкість росту, год^{-1}				Тривалість генерації			
0	0,26	0,149	0,10	0,06	2,65	4,63	6,90	11,1
0,5	0,26	0,15	0,09	0,05	2,65	4,60	7,04	11,8
1	0,26	0,15	0,09	0,05	2,65	4,60	7,04	11,8
2	0,26	0,149	0,09	0,05	2,65	4,63	7,04	11,6
3	0,24	0,142	0,09	0,05	2,87	4,85	7,20	12,1
5	0,24	0,142	0,09	0,05	2,87	4,85	7,30	12,3
8	0,23	0,138	0,09	0,05	3,0	5,0	7,60	12,7
10	0,23	0,13	0,08	0,05	3,0	5,10	7,70	12,7
12	0,23	0,135	0,08	0,05	3,0	5,10	7,70	13,0
14	0,23	0,13	0,08	0,05	3,0	5,10	7,90	13,2
16	0,23	0,13	0,08	0,05	3,0	5,10	7,90	13,2
18	0,22	0,125	0,08	0,04	3,10	5,50	8,30	14,0
20	0,22	0,125	0,08	0,04	3,10	5,50	8,40	14,0

Показники зміни активної та титрованої кислотності також засвідчили пригнічуючий вплив зростаючих концентрацій Na_2SeO_3 (5–20 мкг/см^3) на процес накопичення біомаси. Так, на 24 годину культивування показники рН у контролі становили 5,24 рН, а титрована кислотність становила 52 °Т. У пробі із селенітом натрію 20 мкг/см^3 зафіксовано затримку в процесі накопичення

біомаси. При цьому значення активної кислотності досягли 6,11 рН, а титрованої кислотності лише 30 °Т. Отримані дані засвідчили, що раціональними концентраціями, які не пригнічують приріст селенвмісної біомаси біфідобактерій є 0,5–3 мкг/см³.

Наступним етапом було визначення динаміки накопичення селену культурами досліджуваних мікроорганізмів, результати якого наведені в таблиця 4. Визначено, що зі зростанням концентрацій Na₂SeO₃ в середовищі культивування зростає вміст акумульованого селену. Так, максимальні показники в культурі лакто- та біфідобактерій становили (4698,0 мкг/г та 3149,0 мкг/г, відповідно) при концентрації селену рівній 20 мкг/см³.

Таблиця 4

Динамика накопичення селену культурами бактерій

(n=3, P≥0,95)

Культура мікроорганізмів	Концентрація селеніту натрію до культивування, мкг/см ³	Інтенсивність люмінесценції	Вміст, мкг в 1 г сухої біомаси
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 412/307	Контроль	3	37,5
	0,5	10	105,0
	1	13	195,0
	2	18	450,0
	5	25	975,0
	10	48	2116,0
	14	70	3252,0
	20	98	4698,0
<i>Bifidobacterium bifidum</i> I	Контроль	3	37,5
	0,5	8	97,5
	1	10	200,0
	2	14	435,0
	5	20	787,5
	10	38	1599,7
	14	50	2322,5
	20	52	3149,0

Таким чином, в подальших дослідженнях, з метою створення селенвмісних ДД, селеніт натрію вносили в концентрації 1 мкг/см³.

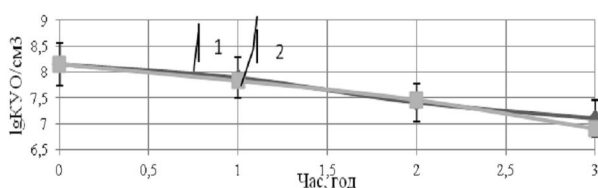


Рис 7. Резистентність *L. acidophilus* до рН 2:1 – селенвмісних лактобактерій; 2 – контроль.

Одним із подальших етапів досліджень була перевірка життєздатності селенвмісної біомаси лакто- та біфідобактерій в умовах *in vitro*, які моделюють ШКТ людини (рН 2 та при дії 40% жовчі).

В процесі досліджень було

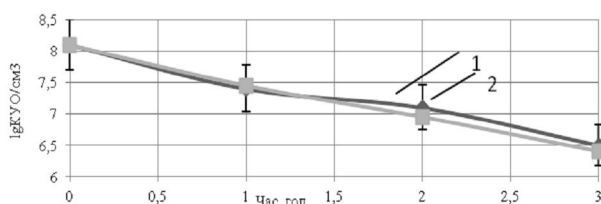


Рис. 8. Резистентність біфідобактерій до рН 2:1 – селенвмісні біфідобактерії; 2 – контроль.

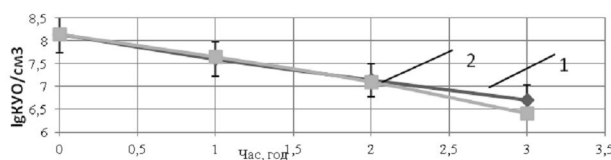


Рис. 9. Резистентність лактобактерій в присутності 40 % жовчі: 1 - селенвмісні лактобактерії; 2 – контроль.

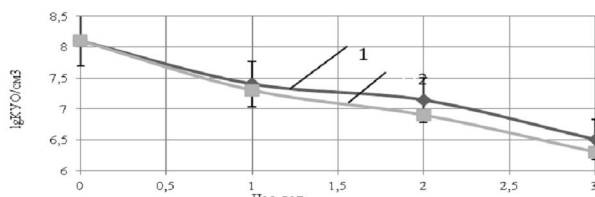


Рис. 10. Резистентність біфідобактерій до жовчі: 1 – селенвмісні біфідобактерії; 2 – контроль.

мікроорганізмів в контрольному зразку становила 7×10^6 КУО/см³ і 4×10^6 КУО/см³ в селеновмісному зразку.

На першу годину інкубації кількість життєздатних клітин біфідобактерій становила порядку 4.3×10^7 КУО/см³. На другу годину інкубації цей показник знизився і досяг 1.4×10^7 КУО/см³ у пробі із селенвмісними біфідобактеріями і 9×10^6 КУО/см³ в контролі. Через три години кількість життєздатних мікроорганізмів становила 5×10^6 КУО/см³ у пробі із селенвмісними біфідобактеріями та 3×10^6 КУО/см³ в контролі.

Таким чином, в процесі дослідів *in vitro* виявлено, що кількість виживших мікроорганізмів достатня для адгезії та фіксації в умовах кишківника. Селенвмісні мікроорганізми не відрізняються за своїми властивостями від контрольних зразків.

Препарати на основі лакто- і біфідобактерій широко використовують для профілактики дисбіозів. Саме тому важливою є перевірка їх на антибіотикорезистентність. Обраними антибіотиками стали бензопеніцилін, тетрациклін та поліміксин.

Дані таблиці 5 свідчать про відсутність чутливості лактобактерій поліміксину і про слабку чутливість досліджуваних мікроорганізмів до бензопеніциліну і тетрацикліну.

виявлено, що через 1 годину кількість лактобактерій, що вижила в усіх зразках становила порядку $8,9..8,6 \times 10^7$ КУО/см³. Через 2 години показники кількості життєздатних клітин лактобактерій знижувалась синхронно в обох зразках.

Експозиція в 3 години показала, що кількість життєздатних клітин лактобактерій становила 1×10^7 КУО/см³ у зразку із вмістом селену і $6,9 \times 10^6$ КУО/см³ у контрольному зразку.

Отримані дані свідчать про більшу чутливість біфідобактерій (у порівняння з лактобактеріями) до умов шлунку *in vitro*, через окисно-відновний потенціал їх клітин, що суттєво впливає на функції біфідобактерій.

Через 1 годину інкубації кількість лактобактерій становила $6.6,5 \times 10^7$ КУО/см³. На 2 годину інкубації цей показник поступово знижувався. На 3 годину інкубації кількість життєздатних

Антибіотикорезистентність лактобактерій

Зразок	Назва антибіотика		
	Бензопеніцилін	Тетрациклін	Поліміксин
селенвмісні лактобактерії	+	+	-
КОНТРОЛЬ	+	+	-

Примітки:

«-» – нема чутливості;

«+» – мала чутливість;

«++» – висока чутливість.

Діаметр зон затримки росту селеновмісної культури лактобактерій відображено на рис. 11. Вплив тетрацикліну на селензбагачену культуру лактобактерій та контрольний зразок відображено в затримці росту культур приблизно до 2,4 см; бензопеніциліну – до 1,7–1,6 см відповідно; поліміксину – до 1,1 см. Отримані результати є свідченням відсутності чутливості до поліміксину і малої чутливості до тетрацикліну і бензопеніциліну селензбагачених культур лактобактерій.

Антибіотикорезистентність селенвмісних та безселенових біфідобактерій відображена на рис. 12. При вивченні впливу поліміксину на життєздатність біфідобактерій відмічено, що кількість життєздатних біфідобактерій в усіх пробах становила 10^7 КУО/см³; бензопеніциліну та тетрацикліну – 10^6 КУО/см³.

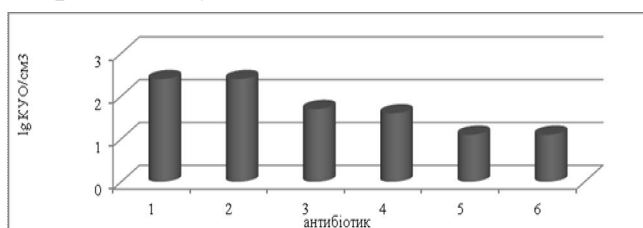


Рис. 11. Показники діаметру зон затримки росту лактобактерій. 1 – вплив тетрацикліну на селензбагачену культуру; 2 – тетрацикліну на безселенову культуру; 3 – вплив бензопеніциліну на селензбагачену культуру; 4 – вплив бензопеніциліну на безселенову культуру; 5 – вплив поліміксину на селензбагачену культуру; 6 – вплив поліміксину на безселенову культуру.

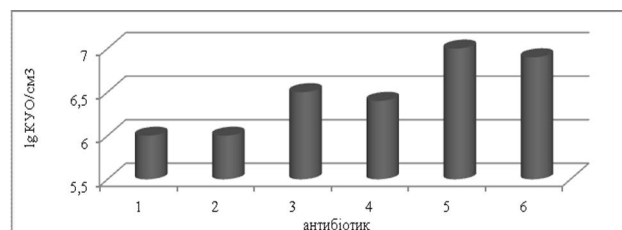


Рис. 12. Антибіотикорезистентність селензбагачених біфідобактерій. 1 – вплив тетрацикліну на селензбагачену культуру; 2 – вплив тетрацикліну на безселенову культуру; 3 – вплив бензопеніциліну на селензбагачену культуру; 4 – вплив бензопеніциліну на безселенову культуру; 5 – вплив поліміксину на селензбагачену культуру; 6 – вплив поліміксину на безселенову культуру.

Виявлено, що чутливість селензбагачених культур лакто- і біфідобактерій була на одному рівні із контрольними зразками. Це свідчить про можливість

використання селензбагачених пробіотичних штамів лакто- і біфідобактерій у профілактиці дисбактеріозів.

Отримані дані служили основою для розробки біологічно активних добавок на основі селенвмісної культури лактобактерій – препарат «Селенолакт»; селенвмісної культури біфідобактерій – препарат «Біфісел»; селенвмісної симбіотичної культури – препарат «Селенобіфілакт».

Органолептична та фізико-хімічна характеристика отриманих селенвмісних препаратів представлена в таблиці 6

Таблиця 6

Органолептичні показники препаратів

Препарат «Селенолакт»	
Показник	Характеристика
Зовнішній вигляд	Порошок з кристалічною чи пористою масою
Смак та запах	Специфічний
Колір	Бежевий
Кількісний вміст селену, мкг/г	195±1
Препарат «Біфісел»	
Зовнішній вигляд	Порошок з кристалічною чи пористою масою
Смак та запах	Специфічний
Колір	Бежевий
Кількісний вміст селену, мкг/г	200±1
Препарат «Селенобіфілакт»	
Зовнішній вигляд	Порошок з кристалічною чи пористою масою
Смак та запах	Специфічний
Колір	Бежевий
Кількісний вміст селену, мкг/г	202,5±1

Кількісний вміст лактобактерій в препараті «Селенолакт» на рівні $2,0 \times 10^9$ КУО/см³; кількісний вміст біфідобактерій в препараті «Біфісел» на рівні $4,4 \times 10^8$ КУО/см³; кількісний вміст лактобактерій в препараті «Селенобіфілакт» на рівні $1,0 \times 10^9$ КУО/см³, а біфідобактерій – $1,2 \times 10^8$ КУО/см³, що відповідає нормам, поставленим щодо препаратів із пробіотичними властивостями.

Протягом 12 місяців зберігання визначали мікробіологічні показники отриманих продуктів. На кінцевий термін зберігання вміст лактобактерій в препараті «Селенолакт» становив $5,5 \times 10^8$ КУО/см³; вміст біфідобактерій у препараті «Біфісел» становив $5,2 \times 10^7$ КУО/см³; вміст лакто- та біфідобактерій в препараті «Селенобіфілакт» становив $3,8 \times 10^8$ КУО/см³ та $5,0 \times 10^7$ КУО/см³, відповідно.

Згідно з літературними даними, наноструктури селену (Se⁰) є побічним продуктом в процесі утворення селеноцистеїну бактеріальною клітиною. Для

отримання наноструктур селену використовували культуру *Lactobacillus acidophilus* 412/307. Наноструктури селену накопичуються в цитоплазмі бактеріальної клітини, а їх надлишок виводиться у культуральне середовище. Вони зберігають властивості селену та здатні встроюватися в клітинні білки. Для отримання наночасток селену необхідно зруйнувати бактеріальну клітину. Для цього проводили серію дослідів по підбору умов, котрі б забезпечили руйнацію бактеріальних клітин. Селенвмісну біомасу обробляли концентрованою соляною кислотою, піддавали впливу низьких температур та мікрохвильового поля.

Таблиця 7

Вплив факторів на руйнування бактеріальних клітин

№ досліді	Обробка соляною кислотою	Заморожування	Вплив мікрохвильового поля	Результат впливу
1	-	-	+	Клітинна стінка не зруйнована
2	+	-	+	Клітинна стінка частково зруйнована
3	-	+	+	Клітинна стінка не зруйнована
4	+	+	+	Клітинна стінка зруйнована

Примітки:

«-» – нема чутливості;

«+» – присутня чутливість

Відмічено, що послідовний вплив концентрованої кислоти, заморожування та мікрохвильового поля викликав процес руйнації цілісності бактеріальних клітин. Результат впливу комбінованих фізико-хімічних факторів представлено на рис.12. Відмічено руйнацію клітинних стінок лактобактерій.

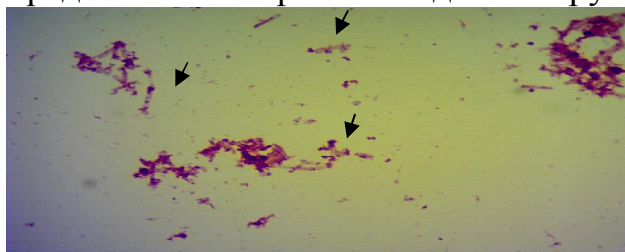


Рис. 12. Результат комбінованого впливу фізико-хімічних факторів (соляної кислоти, заморожування, мікрохвильового поля).

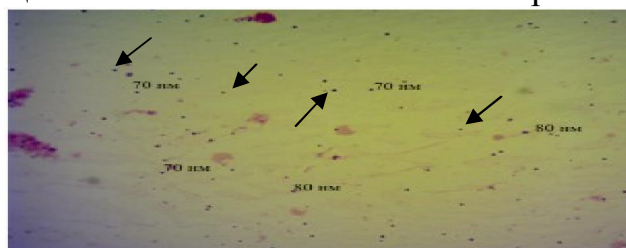


Рис.13. Наноструктури селену.

Отримані наноструктури селену представлено на рис. 13. Розміри структур визначено за допомогою методу пікселів. Визначено, що розміри частинок коливались в межах 70-80 нм. Розхроблений препарат мав

порошкоподібну структуру, світло-рожевий колір, кількісний вміст селену в ньому становив 180 ± 1 мкг/г.

Наступним етапом досліджень стало створення кисломолочних продуктів функціонального призначення на основі селензбагачених пробіотичних препаратів. Для надання продуктам притаманних йогурту характеристик, в процесі сквашування молока, до отриманих селенвмісних культур додавали закваски прямого внесення *LYOBAC YO-YO* фірми «Hansen» (Данія), які містили у своєму складі йогуртові культури *Lb. bulgaricus* та *S. thermophilus*.

Вміст лактобактерій у кисломолочному продукті на основі препарату «Селенолакт» становив $4,8 \times 10^9$ КУО/см³. Час сквашування становив 6,5 год. За органолептичними показниками отриманий продукт характеризувався однорідною, щільною, злегка в'язкою консистенцією; чистим, кисломолочним смаком та запахом; білим, рівномірним за всією поверхнею кольором. Вміст біфідобактерій у кисломолочному продукті на основі препарату «Біфісел» становив $2,1 \times 10^8$ КУО/см³. Час сквашування становив 20 год. За органолептичними показниками отриманий продукт характеризувався однорідною, щільною, злегка в'язкою консистенцією; чистим, кисломолочним смаком та запахом; білим, рівномірним за всією поверхнею кольором. Вміст лактобактерій у кисломолочному продукті на основі препарату «Селенобіфілакт» становив $1,0 \times 10^9$ КУО/см³ (лактобактерій) та $2,0 \times 10^8$ КУО/см³ (біфідобактерій).

За органолептичними показниками отриманий продукт характеризувався однорідною, щільною, злегка в'язкою консистенцією; чистим, кисломолочним смаком та запахом; білим, рівномірним за всією поверхнею кольором.

У четвертому розділі наведено результати оптимізації умов культивування лакто- та біфідобактерій в присутності джерела селену, наведено принципи технологічні схеми виробництва селенвмісних ДД та препарату «Наноселеніум»; наведено результати медико-біологічних досліджень їх безпеки.

Важливим завданням в процесі розробки технології отримання селензбагачених пробіотичних культур лакто- та біфідобактерій був підбір оптимальних середовищ культивування, які б дали можливість отримати, на завершальному етапі культивування, максимальний вихід біомаси селензбагачених мікроорганізмів.

В якості критеріїв оптимальності було обрано основні показники, характеризуючи вихід біомаси мікроорганізмів в процесі їх культивування:

1. Показники колоніє утворюючих одиниць (КУО).
2. Кількісний вміст селену в середовищі культивування
3. Показники оптичної густини
4. Показники активної кислотності
5. Показники титрованої кислотності

За отриманими даними знаходили такі функції оптимізації, як залежність критеріїв від параметрів. Отримані поверхні описані поліномом 3 степені, яка має вигляд:

$$Z=a+bx+cy+dx^2+ey^2+fxz+gx^3+hy^3+ixy^2+jx^2y \quad (1)$$

За допомогою програми Table Curve 3D отримані коефіцієнти залежності для визначення зміни КУО/см³ в кожному середовищі культивування. За допомогою класичних методів оптимізації знайдено оптимальні параметри часу культивування та вмісту селену. Тобто, оптимальним часом культивування на MRS бульйоні є 25,9 год, оптимальним вмістом селеніту натрію в середовищі культивування є 1,9 мкг/см³.

Оптимальним часом культивування лактобактерій на середовищі із сирної сироватки є 25,5 год, а оптимальним вмістом селеніту натрію – 1,9 мкг/см³, оптимальним часом культивування біфідобактерій на кукурудзяно-лактозному середовищі є 24,5 год, а оптимальним вмістом селеніту натрію – 1,6 мкг/см³.

Схема виробництва дієтичних добавок на основі пробіотичних селенвмісних культур лакто- та біфідобактерій представлено на рис. 14.

На початковому етапі готували середовища для культивування мікроорганізмів та додавали водний 0,1 % розчин селеніту натрію (1 мкг/см³).

Стерилізацію проводили при температурі 121 °С, протягом 20 хв. Середовище охолоджували до температури заквашування та вносили 5% добової культури мікроорганізмів. В якості стимулятора росту для культури біфідобактерій використовували фруктозу, котру додають в кількості 0,1 % від загального вмісту середовища культивування. Культивування проводять протягом 24 год, при 37 °С. При виробництві симбіотичного селенвмісного препарату готували середовища культивування для лакто- та біфідобактерій. Спочатку засівали культуру біфідобактерій, в кількісному об'ємі 5%, з додаванням 0,1 % фруктози. Na₂SeO₃ вносили в кількості 1 мкг/см³. Культивування проводили протягом 15 год. Додавали середовище для культивування лактобактерій, з подальшою інокуляцією в кількості 5%. Культивування проводили протягом 24 год. Для відділення селензбащеної біомаси мікроорганізмів від середовища культивування та неорганічного селену який в них міститься, вирощену культуру мікроорганізмів центрифугували в проточній центрифугі, при 10000 об/хв., протягом 10 хв, з наступним промиванням стерильною водою. Отриману селенвмісну біомасу ресуспендували захисним середовищем (що містило наступні компоненти, %: сахарозу – 50, желатозу – 25, молоко – 25), у співвідношенні 1:1. Отриману суміш заморожували з подальшою ліофілізацією та, в подальшому, проводили подрібнення і таблетування отриманої суміші. Завершальним етапом технологічних операцій було фасування таблеток.

Препарат «Наноселеніум» розробляли на основі селенвмісної культури *Lactobacillus acidophilus* 412/307. На початковому етапі готували середовище культивування для лактобактерій, селеніт натрію вносили в кількості 20 мкг/см³ (стерилізація при 1 атм, протягом 30 хв). Інокулят добової культури лактобактерій вносили в кількості 5%. Культивування проводили протягом 24 год, при 37 °С. Отриману біомасу відділяли від середовища культивування шляхом центрифугування при 10000 об/хв, протягом 10 хв, з подальшим

видаленням супернатанту. До отриманої біомаси додавали стерильну воду, у співвідношенні 1:1 та центрифугували за вище згаданими режимами з видаленням супернатанту. До промитої селенвмісної біомаси додавали концентровану соляну кислоту, у співвідношенні 1:1, експозицію проводили 4 доби. Кислоту видаляли, а до селенвмісної біомаси додавали стерильну воду та перемішували до утворення однорідної суспензії. Воду видаляли шляхом центрифугування при 10000 об/хв., протягом 10 хв. Отриману біомасу заморожували і витримували в умовах морозильника протягом 1 доби, а далі в умовах мікрохвильового поля, протягом 15 хв, після чого додавали стерильну воду у співвідношенні 3:1 та перемішували до утворення однорідної суміші. Задля відділення наночасток селену від уламків бактеріальних клітин отриману суміш фільтрували за допомогою вакуум-фільтру.

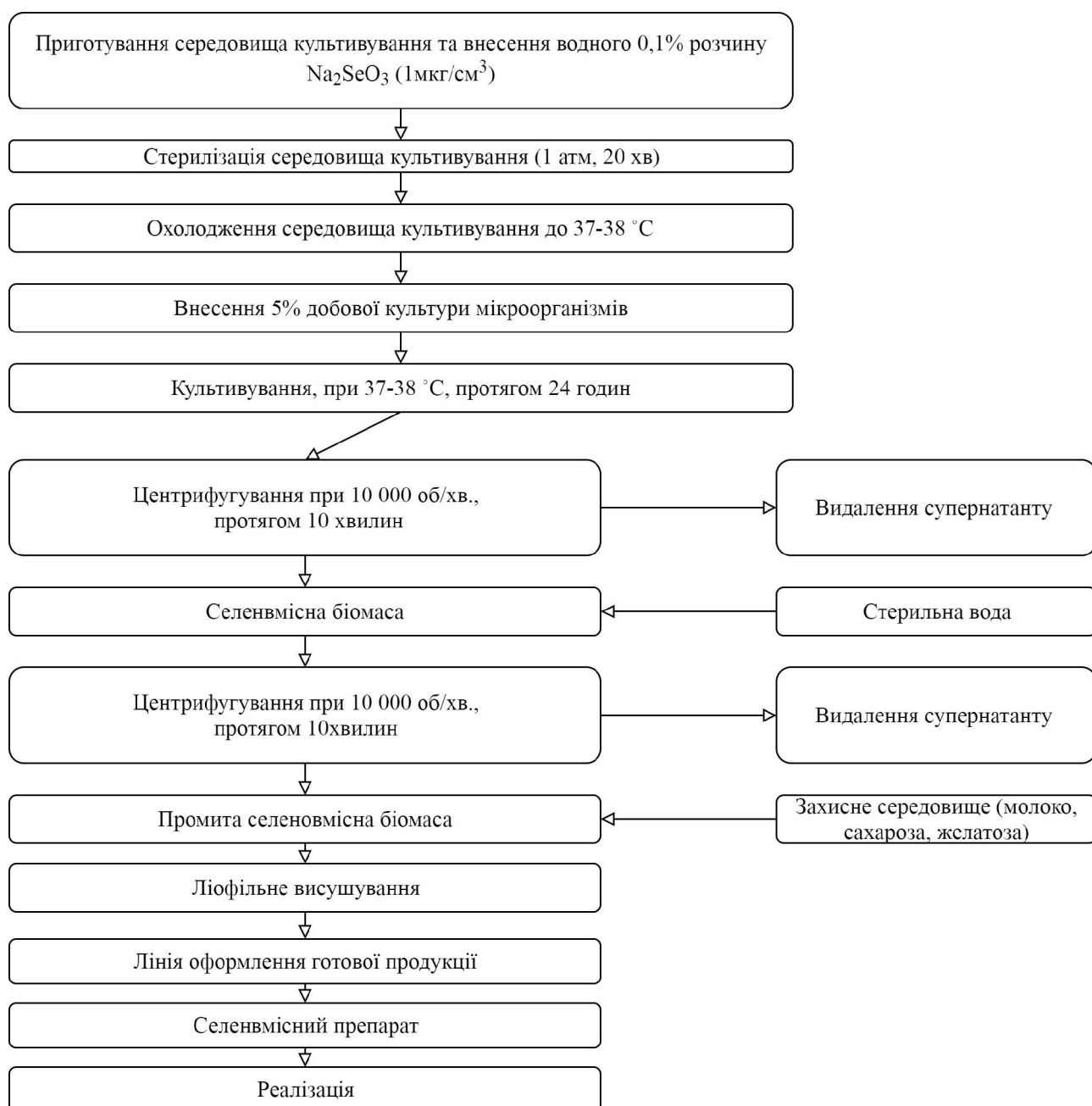


Рис.14. Принципова технологічна схема одержання селенвмісного препарату

Отриманий продукт на фасувально-пакувальному автоматі фасували в поліетиленові флакони.

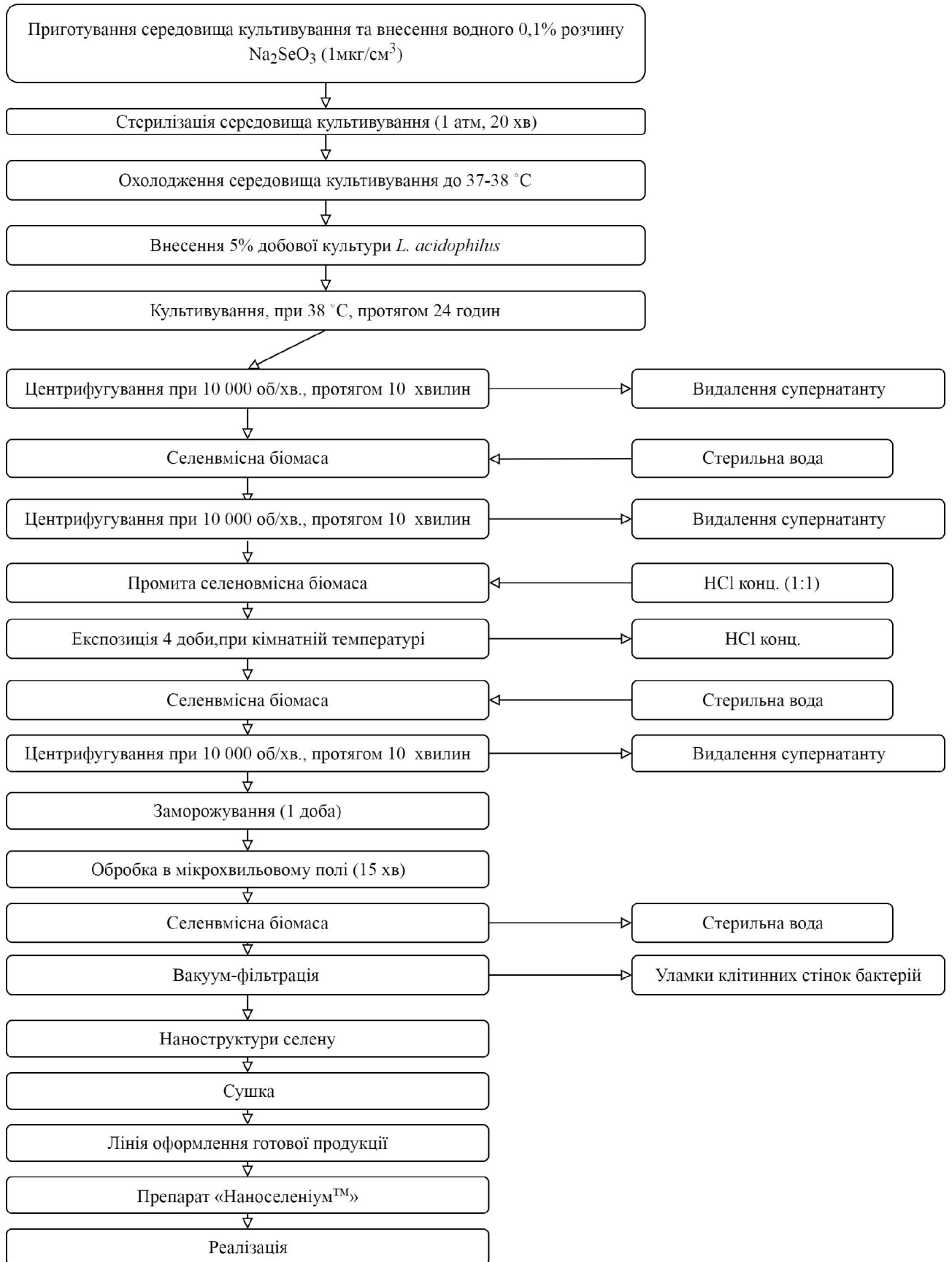


Рис. 15. Принципова технологічна схема одержання препарату «Наноселеніум»

Задля відділення наночасток селену від уламків бактеріальних клітин отриману суміш фільтрували за допомогою вакуум-фільтру. Отриманий продукт на фасувально-пакувальному автоматі фасували в поліетиленові флакони.

Проведено промислову апробацію на підприємстві ООО НПО «Аріадна». Показники препаратів із дослідних партій відповідають нормативно-технічній документації. Отриманим ДД присвоєно назви: «Селенолакт™» (ТУ У 24.14-02071062-001:2016 та ТІ), «Біфілакт™» (ТУ У 24.14-02071062-002:2016 та ТІ), «Селенобіфілакт™» (ТУ У 24.14-02071062-003:2016 та ТІ), та «Наноселеніум™» (ТУ У 24.14-02071062-004:2016 та ТІ).

Перевірка безпеки препаратів «Селенолакт», «Біфілакт», «Селенобіфілакт» та «Наноселеніум» проводилась в експериментальних умовах на лабораторних тваринах, а саме безпородних білих мишах. Лабораторних тварин було розділено на 5 груп (по 10 штук в кожній). Першій групі до стандартного раціону додавали препарат «Селенолакт»; другій – препарат «Біфісел»; третій – препарат «Селенобіфілакт»; четвертій – препарат «Наноселеніум»; п'ята група служила контролем.

В процесі дослідження було виявлено, що в дослідних групах мишей, як і у контрольній групі шерстний покрив тварин був сухим, блискучим, видимі слизові – блідо-рожеві. В ході експерименту не було виявлено статистично значущих змін маси тіла мишей дослідних груп у порівнянні з контролем. Відмічено зростання вмісту лакто- та біфідобактерій на 1,5 порядки, у порівнянні з контрольною групою. Кількість біфідобактерій зросла на 2 порядки. Після прийому препаратів відмічено підвищення активності глутатіонпероксидази в 1,5 разів, у порівнянні із контролем. Таким чином, підтверджено пробіотичні властивості отриманих препаратів, а також перевірена їх біологічна безпека.

Собівартість отриманих функціональних інгредієнтів, яка для препарату «Селенолакт™» становить 54,68 грн; для препарату «Біфісел™» – 55,99 грн; для препарату «Селенобіфілакт™» – 59,2 грн; для препарату «Наноселеніум™» – 54,62 грн.

ВИСНОВКИ

На підставі проведених теоретичних та експериментальних досліджень розроблені біотехнології отримання селенвмісних пробіотичних добавок, харчових функціональних продуктів та нанорозмірного препарату селену.

1. Обґрунтовано доцільне використання культури *Lactobacillus acidophilus* 412/307 та *Bifidobacterium bifidum* I для виробництва селенвмісних дієтичних добавок з високими пробіотичними та антагоністичними властивостями.

2. В якості живильного середовища для культури *Lactobacillus acidophilus* 412/307 було обрано середовище із сирної сироватки; для культури *Bifidobacterium bifidum* I – кукурудзяно-лактозне середовище. Критерієм вибору служив порівняльний аналіз середовищ культивування за динамікою накопичення біомаси досліджуваних мікроорганізмів.

3. Визначено, що найкраще акумулюється та біотрансформується досліджуваними мікроорганізмами селеніт натрію (кількість селену в отриманій селенвмісній біомасі лактобактерій становила 370 мкг, а в селенвмісній культурі біфідобактерій – 355 мкг), на основі проведеного підбору препаратів неорганічного селену (селеніт натрію, селенат натрію, селениста кислота).

4. Досліджено вплив зростаючих концентрацій селеніту натрію на ріст і активність пробіотичних мікроорганізмів. Встановлено, що оптимальними концентраціями селеніту натрію, які не пригнічують приріст біомаси лактобактерій є 0,5-5 мкг/см³, а для біфідобактерій 0,5-3 мкг/см³, а часом культивування є 24 години. Кількість селенвмісних лактобактерій досягає 10⁹ КУО/см³, а біфідобактерій – 10⁸ КУО/см³, порівняно зі зразком із максимальним вмістом Na₂SeO₃ – 20 мкг/см³. Визначена пряма залежність між вмістом Na₂SeO₃ в середовищі культивування та процесом його акумуляції мікроорганізмами. Найбільша кількість акумульованого Na₂SeO₃ виявлена у зразку із вмістом 20 мкг/см³, порівняно з контролем. В культурі лактобактерій показники досягнули 4698,0 мкг/г, а в культурі біфідобактерій – 3149,0 мкг/г).

5. Досліджено селенвмісні дієтичні добавки за органолептичними, фізико-хімічними показниками та мікробіологічними показниками. Визначено вміст лактобактерій у препараті «Селенолакт», що становив 2,0×10⁹ КУО/см³ (кількість органічного селену в продукті – 195±1 мкг/г); кількісний вміст біфідобактерій в препараті «Біфісел» на рівні 4,4×10⁸ КУО/см³ (кількість органічного селену в продукті – 200±1 мкг/г); кількісний вміст лактобактерій в препараті «Селенобіфілакт» на рівні 1,0×10⁹ КУО/см³, а біфідобактерій – 1,2×10⁸ КУО/см³ (кількість органічного селену в продукті – 202,5±1 мкг/г). Розроблено препарат на основі наноструктур селену із вмістом селену 180±1 мкг/г.

6. Визначено, що впродовж 1 року зберігання селенвмісні дієтичні добавки не втратили свою активність. На кінцевий термін зберігання вміст лактобактерій в препараті «Селенолакт» становив 3,5×10⁸ КУО/см³; вміст біфідобактерій у препараті «Біфісел» становив 5,2×10⁷ КУО/см³; вміст лакто- та біфідобактерій в препараті «Селенобіфілакт» становив 3,8×10⁸ КУО/см³ та 5,0×10⁷ КУО/см³, відповідно.

7. Розроблено технологічні схеми отримання селенвмісних дієтичних добавок та препарату на основі наноструктур селену.

8. Розроблено нормативну документацію з отримання селенвмісних продуктів (ТУ У 24.14-02071062-001:2016 та ТІ), «Біфілакт™» (ТУ У 24.14-02071062-002:2016 та ТІ), «Селенобіфілакт™» (ТУ У 24.14-02071062-003:2016 та ТІ), «Наноселеніум™» (ТУ У 24.14-02071062-004:2016 та ТІ) та визначено собівартість та економічну ефективність отриманих продуктів (для препарату «Селенолакт™» становить 54,68 грн; для препарату «Біфісел™» – 55,99 грн; для препарату «Селенобіфілакт™» – 59,2 грн; для препарату «Наноселеніум™» – 54,62 грн). Проведені 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.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України

1. Капрельянц, Л. В. Кінетичні параметри накопичення біомаси *Lactobacillus asidophilus* на середовищах із селеном [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. – Одеса, 2015. – Вип. 46. – Т. 2. – С. 112–115.

2. Капрельянц, Л. В. Зміна показників кінетичних параметрів накопичення біомаси *Lactobacillus asidophilus* та *Bifidobacterium bifidum* при культивуванні на селеновмісних середовищах [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. Львів, 2015. – Вип. 1. – Т. 61. – С. 28–37.

3. Капрельянц, Л. В. Культивування біфідо- і лактобактерій на середовищах із селенітом натрію [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб, О. О. Лівенцова // Харчова наука і технологія. – Одеса, 2016. – Вип. 1. – Т. 10. – С. 26–31.

4. Капрельянц Л. В. Technology of production biological active additive based on selenium containing culture of bifidobacterium [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб, О. В. Зиков // Харчова наука і технологія. – Одеса, 2017. – Вип. 1. – Т. 11. – С. 32–36.

5. Капрельянц Л. В. Dietary supplements based on selenium containing culture of lactic acid bacteria [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб, О. В. Зиков // Харчова наука і технологія. – Одеса, 2017. – Вип. 2. – Т. 11. – С. 21–25.

Патенти

6. Пат. на корисну модель № 111251 Україна, Спосіб одержання пробіотичної селеновмісної добавки [Текст] / Л. В. Капрельянц., Н. С. Трегуб: заявник та патентовласник Одеська національна академія харчових технологій. – № 2016 03423; заявл. 04.04.2016; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 21. – 4 с.

Наукові праці, опубліковані в наукових журналах

7. Капрельянц, Л. В. Селензбагачені пробіотичні продукти функціонального призначення [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Мікробіологія і біотехнологія темат. зб. наук. пр. – Одеса, 2016. – Вип. 1. – Т. 33. – С. 6–19.

8. Капрельянц, Л. В. Селензбагачені біологічно активні добавки [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe. – 2016. – Вип. 7. – Т. 11. – С. 82–87.

Тези доповідей на науково-практичних конференціях

9. Капрельянц, Л.В. Порівняння кінетичних параметрів накопичення біомаси *Lactobacillus asidophilus* на MRS бульйоні та середовищі із сирної сироватки [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології: Матер. IV міжн. наук.-практ. конф.,

дати (16-17 жовтня 2014 р.) / редкол.: В. П. Черних [та ін.]; Національний фармацевтичний ун-т. – Х.: НФаУ, 2014 р.– С. 130–131.

10. Капрельянц, Л. В. Вплив селеніту натрію на чутливість культури *Lactobacillus asidophilus* до дії антибіотиків [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Харчові продукти та біотехнологія: сучасний стан і перспективи розвитку: Матер. міжн. наук.-практ. інтернет-конф., дати (17-18 грудня 2015 р.) / редкол.: С. В. Гаркуша [та ін.]; Полтавський ун-т економіки і торгівлі. – П.: ПУЕТ, 2015 р.– С. 9.

11. Капрельянц, Л. В. Вплив концентрацій селену на процес кислотоутворення селен збагаченої біомаси лактобактерій [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті: Мат. 81 міжн. наук.-практ. конф., дати (23-24 грудня 2015 р.) / редкол.: А. І. Українець [та ін.]; К.: НУХТ, 2015 р. – Т. 4. – С. 31.

12. Капрельянц, Л. В. Визначення оптичної щільності інокуляту *B. bifidum* на середовищі із соєвого екстракту з додаванням селеніту натрію [Текст] / Л. В. Капрельянц, Н. С. Трегуб // Готельно-ресторанний бізнес: інноваційні напрями розвитку: Матер. Міжн. наук-практ конф., дати (25-27 березня 2015 р.) / редкол.: А. І. Українець [та ін.]; К.: НУХТ, 2015. – С. 70.

13. Трегуб Н. С. Симбіотична селензбагачена біологічно активна добавка [Текст] / Н. С. Трегуб // Інтеграційна система освіти, науки і виробництва в сучасному інформаційному просторі: Матер. III міжн. наук.-практ конф., дати (19-20 травня 2016 р.) / редкол.: І. І. Водяник [та ін.]; Т.: ІКСГ19-П НААН, 2016 р. – С. 16.

АНОТАЦІЯ

Зикова Н. С. Біотехнологія селенвмісних пробіотиків. – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеню кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20. – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій Міністерства освіти і науки України, Одеса, 2017.

Дисертаційна робота присвячена науковому обґрунтуванню і розробці технологій отримання селенвмісних пробіотиків та препаратів наноселену.

Проведено підбір раціонального джерела селену для його біотрансформації культурами лакто - та біфідобактерій. Таким джерелом обрано селеніт натрію (Na_2SeO_3). Визначено, що раціональним середовищем накопичення селенвмісної біомаси лактобактерій є середовище із сирної сироватки. Виявлено пригнічуючий вплив концентрацій 5–20 мкг/см^3 на динаміку накопичення мікроорганізмів. Досліджено процес асиміляції та біотрансформації селеніту натрію мікроорганізмами. Встановлено пряму залежність між масовою часткою Na_2SeO_3 в середовищі культивування та вмістом органічного селену, накопиченого мікроорганізмами. Проведено досліди по визначенню життєздатності селенвмісних мікроорганізмів в умовах *in vitro* шлунково-кишкового тракту та їх антибіотикорезистентність.

Проведено підбір умов, які б забезпечували максимальне руйнування бактеріальних клітин та вивільнення наноструктур селену для його отримання. Доведено, що такими умовами є комбінований вплив концентрованої соляної кислоти, заморожування та дія мікрохвильового поля. За допомогою методу пікселів визначено розміри наноструктур.

На основі отриманих даних створено селенвмісні препарати на основі селензбагачених пробіотиків та препарат наноструктурований селен. Досліджено мікробіологічні, органолептичні та фізико-хімічні властивості отриманих продуктів. Розроблено технологічні схеми отримання продуктів. Наведено економічне обґрунтування виробництва селенвмісних біологічно активних добавок. Проведені медико-біологічні дослідження.

Ключові слова: лактобактерії, біфідобактерії, пробіотики, селен, функціональний продукт.

АННОТАЦІЯ

Зыкова Н. С. Биотехнология селенсодержащих пробиотиков. – Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20. - Биотехнология. – Одесская национальная академия пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Одесса, 2017.

Диссертация посвящена научному обоснованию и разработке технологий получения селенсодержащих пробиотиков и препаратов селена.

На первом этапе проведен подбор оптимального источника селена для его биотрансформации культурами лакто- и бифидобактерий. В качестве исследуемых неорганических источников селена использовали селенистую кислоту (H_2SeO_4), селенат натрия (Na_2SeO_4) та селенит натрия (Na_2SeO_3), которые добавляли в среду культивирования, непосредственно перед инокуляцией микроорганизмов. С помощью флуориметрического метода определено количественное содержание аккумуляированного микроорганизмами селена. Для культуры лактобактерий составляло 370 мкг/г, а для бифидобактерий – 355 мкг/г.

Проведен подбор питательных сред для исследуемых культур лакто- и бифидобактерий. Показателями характеризующими накопление биомассы микроорганизмов были КОЕ/см³, оптическая плотность, удельная скорость роста, длительность генерации. В течение всего процесса культивирования микроорганизмов по выше указанным показателям определяли динамику накопления культур лакто- и бифидобактерий. Определено, что оптимальной средой накопления селенсодержащей биомассы лактобактерий является среда с творожной сыворотки (творожная сыворотка, молоко, нартий уксуснокислый, сульфат магния, кукурузный экстракт), для бифидобактерий – кукурузно-лактозная среда (лактоза, пептон, цитрат натрия, калий фосфорнокислый, натрий фосфорнокислый, аскорбиновая кислота, кукурузный экстракт, вода). Определено угнетающее влияние концентраций селенита натрия 5–20 мкг/см³ на динамику накопления микроорганизмов лактобактерий и 3–20 мкг/см³ – для бифидобактерий.

С помощью флуориметрического метода, с использованием 2,3-диаминонафталина, исследован процесс ассимиляции и биотрансформации селенита натрия исследуемыми микроорганизмами. Определена прямая зависимость между массовой долей Na_2SeO_3 в среде культивирования и содержанием органического селена накопленного микроорганизмами. При добавлении $0,5 \text{ мкг/см}^3$ селенита натрия в среду культивирования лактобактерий, количество органического селена в биомассе составляло 105 мкг/г , для бифидобактерий данный показатель составлял $97,5 \text{ мкг/г}$. При добавлении 20 мкг/см^3 селенита натрия в биомассе лактобактерий количество органического селена составило 4698 мкг/г , а для бифидобактерий – 3149 мкг/г , соответственно.

Определена антибиотикорезистентность исследуемых пробиотических селенсодержащих культур и культур исследуемых микроорганизмов не содержащих селен. Наибольшую чувствительность микроорганизмы проявляли к тетрациклину, несколько меньше – к бензопенициллину и практически не отмечено чувствительность к полимиксину. Определено, что содержание органического селена в микроорганизмах не вызывает повышение их чувствительности к действию антибиотиков, что является важным в процессе приема селенсодержащих препаратов на фоне антибиотикотерапии.

Проведены опыты по определению выживаемости селенсодержащих микроорганизмов в условиях ЖКТ. Проведены опыты *in vitro* по определению влияния среды желудка и влияния желчи, в процессе прохождения препаратов селенсодержащих пробиотиков через отделы желудочно-кишечного тракта.

Проведен подбор условий, обеспечивающих разрушение бактериальных клеток, для получения наноструктур селена. Такими условиями являются комбинированное воздействие концентрированной соляной кислоты, замораживания и действия микроволнового поля. С помощью метода пикселей определены размеры наноструктур селена.

На основе полученных данных созданы селенсодержащие биологически активные добавки из селенобогатых пробиотиков, а также наноструктурированный селен. Исследованы микробиологические, органолептические и физико-химические свойства полученных продуктов.

По микробиологическим показателям содержание лактобактерий в препарате «Селенолакт» составил $2,0 \times 10^9 \text{ КОЕ/см}^3$ (количество органического селена в продукте – $195 \pm 1 \text{ мкг/г}$) количественное содержание бифидобактерий в препарате «Бифисел» на уровне $4,4 \times 10^8 \text{ КОЕ/см}^3$ (количество органического селена в продукте – $200 \pm 1 \text{ мкг/г}$) количественное содержание лактобактерий в препарате «Селенобифилакт» на уровне $1,0 \times 10^9 \text{ КОЕ/см}^3$, а бифидобактерий – $1,2 \times 10^8 \text{ КОЕ/см}^3$ (количество органического селена в продукте – $202,5 \pm 1 \text{ мкг/г}$). Разработан препарат на основе наноструктур селена с содержанием селена $180 \pm 1 \text{ мкг/г}$.

На основе разработанных селенсодержащих препаратов получено кисломолочные продукты функционального назначения с пробиотической дозой культур лакто- и бифидобактерий.

Разработаны технологические схемы получения продуктов, которые включают следующие этапы: культивирование на среде из творожной сыворотки (для лактобактерий) и кукурузно-лактозной среде (для бифидобактерий); отделение селенсодержащей биомассы микроорганизмов; промывание селенсодержащей биомассы; добавление защитной среды; лиофильное высушивание. Разработанная биотехнологическая схема получения препарата «Наноселениум», что состоит из культивирования лактобактерий на среде из сырной сыворотки, отделение селенсодержащей биомассы микроорганизмов, промывание биомассы, добавление концентрированной HCl с последующей выдержкой в течение 4 суток, замораживание в условиях морозильной камеры, в течение суток, воздействие микроволновым полем (10-15 минут), вакуум-фильтрация и высушивание. Приведены экономическое обоснование производства селенсодержащих биологически активных добавок.

Разработана нормативная документация по получению препарата «Селенолакт» (ТУ У 24.14-02071062-001:2016 та ТІ), «Бифисел» (ТУ У 24.14-02071062-002:2016 та ТІ), «Селенобифилакт» (ТУ У 24.14-02071062-003:2016 та ТІ), «Наноселениум» (ТУ У 24.14-02071062-004:2016 та ТІ).

Проведена исследовательско-промышленная апробация разработанной биотехнологии получения функциональных ингредиентов на предприятии ООО НПО «Ариадна» (г. Одесса).

Проведены медико-биологические исследования функциональных ингредиентов. В процессе эксперимента определено, что препараты характеризуются высокими пробиотическими и антиоксидантными свойствами и не вызывают негативного воздействия на состояние здоровья исследуемых мышей. Не было обнаружено статистически значимых изменений массы тела мышей исследовательских групп, по сравнению с контролем.

Ключевые слова: лактобактерии, бифидобактерии, пробиотики, селен, функциональный продукт.

ANNOTATION

Zykova N. S. Biotechnology of selenium-containing probiotics. - the manuscript. Thesis for scientific degree of candidate of technical sciences on specialty – 03.00.20. – Biotechnology. Odessa National Academy of Food Technologies, The Ministry of Education and Science of Ukraine, Odessa, 2017.

The dissertation is devoted to scientific justification and development of technology of getting selenium-containing probiotics and selenium-containing preparats.

In the first stage held the selection of optimal source of selenium for its biotransformation by cultures of lactobacilli and bifidobacteria. Such a source is sodium selenite (Na_2SeO_3).

It was determined that the optimal medium accumulation of selenium-containing biomass is lactobacillus medium is a cheese whey. It was defined depressing effect concentrations of sodium selenite 5–20 g / cm³ on the dynamics of accumulation microorganisms.

It was investigated the process of assimilation and biotransformation sodium selenite by microorganisms. It was determined a direct correlation between the content Na_2SeO_3 in the culture medium and the content of organic selenium accumulated by microorganisms.

Experiments were performed to determine the survival rate of selenium-containing microorganisms in the conditions of the digestive tract and their antibiotic resistance.

Spend a selection of conditions to ensure the destruction of bacterial cells to produce selenium nanostructures. These conditions are the combined effects of concentrated hydrochloric acid, freeze and microwave field action. The method defined pixel size selenium nanostructures.

On the basis of the data set selenium dietary supplements from selenium containing probiotics, as well as the preparation of selenium nanostructures. Investigated microbiological, organoleptic and physico-chemical properties of the products obtained.

Keywords: lactic acid bacteria, bifidobacteria, probiotics, selenium, functional product.