

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним із пріоритетних напрямів сучасної молочної промисловості є виробництво натуральних кисломолочних продуктів із „живими” спеціально підібраними культурами молочнокислих бактерій, без консервантів і жорсткої термічної обробки, продуктів функціональної дії (Ганина, Большакова, 2001).

Залучення до раціону харчування таких кисломолочних продуктів дозволяє без використання лікувальних препаратів поліпшити загальний стан здоров'я людини шляхом впливу біологічно активної мікрофлори на мікроекологію кишечника, перетравлювання та засвоєння їжі. Реальні переваги від споживання функціональних молочних продуктів полягають у пригніченні кишкових патогенних мікроорганізмів, поліпшенні засвоєння лактози, зниженні рівня холестерину в сироватці крові та стимуляції імунної системи (Heller, 2001).

Традиційно до складу бактеріальних препаратів, призначених для виробництва функціональних молочних продуктів, залучають біфідобактерії та ацидофільні палички. За кордоном, зокрема в Японії, Америці та Австралії застосовують також бактерії виду *Lactobacillus casei* (Spanhaak, 1998). Аналогічні вітчизняні розробки бактеріальних препаратів такого типу відсутні. Тому створення бактеріальних препаратів із залученням бактерій виду *L. casei* та розробка сучасних технологій промислового виробництва функціональних молочних напоїв з їх використанням є актуальною і своєчасною задачею.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконувалась у відділах біотехнології та технології молочних продуктів Технологічного інституту молока та м'яса УААН у межах 2 науково-технічних програм УААН на 1996-2000 та 2001-2005 рр. “Переробка молока і м'яса” (завдання 2.01.12 “Провести відбір та селекцію штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями, перспективних для використання у виробництві молочних продуктів спеціального призначення”, № держреєстрації 0101U002287, завдання 2.01.03 “Розробити технологію виробництва функціональних молочних продуктів з культурами високої біологічної активності”, № держреєстрації 0199U000268).

Мета і задачі досліджень. Метою роботи була розробка біотехнології бактеріальних препаратів для функціональних молочних напоїв із залученням *Lactobacillus casei ssp. casei*.

Для реалізації вказаної мети вирішували наступні **задачі**:

- виділення з природних джерел штамів молочнокислих бактерій та скринінг їх за критеріями функціональної активності та технологічності;
- селекція штамів лактобацил зі зниженою енергією кислотоутворення з використанням техніки одержання та регенерації протопластів;
- розроблення технологій бактеріальних препаратів та функціональних молочних напоїв з їх застосуванням, розробка та затвердження відповідних

- нормативних документів;
- дослідження функціональної активності новостворених бактеріальних препаратів і продуктів у дослідах *in vitro* та *in vivo*;
- апробація та впровадження розроблених біотехнологій у промисловість.

Об'єктами досліджень були чисті культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus acidophilus* та *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, бактеріальні композиції, бактеріальні препарати прямого внесення, ферментовані молочні продукти.

Предмет досліджень - біотехнологічні властивості молочнокислих бактерій, біохімічні процеси та кінетичні параметри росту штамів у моно- та багатокомпонентній культурі, мікробіологічні, фізико-хімічні та функціональні властивості бактеріальних препаратів і ферментованих ними продуктів, органолептичні показники кисломолочних продуктів.

Методи досліджень. У роботі застосовано традиційні та сучасні мікробіологічні, генетичні, біохімічні, технологічні та статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше в Україні науково обґрунтовано та доведено ефективність залучення до складу бактеріальних препаратів лактобацил - представників нормальної мікрофлори людини виду *L. casei* ssp. *casei* для розширення спектру функціональної дії ферментованих ними продуктів. Вперше встановлено можливість застосування техніки утворення та регенерації протопластів для стабілізації кислотоутворення ацидофільних мікроорганізмів, розроблено методологію та проведено селекцію штаму *Lactobacillus acidophilus* зі зниженою на 21 % енергією кислотоутворення. Визначено оптимальні біотехнологічні параметри і режими виробництва нових бактеріальних препаратів прямого внесення ЛТС і ЛТС-Н, які дають змогу зберегти високий рівень біологічної активності селекціонованих бактерій впродовж технологічного циклу, а саме: створено ефективні бактеріальні композиції, встановлено спосіб підготовки посівного матеріалу, склад поживного середовища, умови культивування, ліофільного сушіння та зберігання біомаси. Встановлено закономірності мікробіологічних, біохімічних і фізико-хімічних перетворень компонентів молока за його ферментації новоствореними бактеріальними препаратами, які забезпечують високу якість та функціональну активність кисломолочного продукту.

Практичне значення одержаних результатів.

Завдяки застосуванню сучасних біотехнологічних підходів відібрано 4 промислово цінні культури молочнокислих бактерій: *L. casei* ssp. *casei* 302, *L. acidophilus* 35 і 21 та *S. salivarius* ssp. *thermophilus* 21. Штам *L. acidophilus* 21 захищено деклараційним патентом України № 64347 А; на штам *L. casei* ssp. *casei* 302 подано заявку (заявка № 2004032040 А на патент України від 19.03.04). Вперше в Україні розроблено біотехнологію заквашувальних бактеріальних

препаратів із залученням *L. casei* ssp. *casei*. Їх застосування у виробництві кисломолочного напою дозволяє одержати функціональний продукт з високим вмістом біологічно активної мікрофлори, вільних амінокислот, в тому числі незамінних, зниженим рівнем лактози та холестерину. Оригінальність бактеріальної композиції та новизну технологічних рішень виробництва бактеріального препарату на її основі підтверджено деклараційним патентом України № 56385 А. Модифікація бактеріальної композиції за рахунок використання штаму *L. acidophilus* 21 зі зниженою енергією кислотоутворення дозволила вирішити важливу біотехнологічну задачу – подовжити у 2,8 рази термін зберігання кисломолочного продукту. За результатами дисертаційної роботи розроблено 2 пакети нормативних документів: ТУ У 46.39 ГО 312-2000 “Концентрат бактеріальний сухий для кисломолочних напоїв ЛТС” (види ЛТС і ЛТС-Н); ТУ У 46.39 ГО 311-2000 „Продукт кисломолочний Міленіум”. Біотехнології бактеріальних препаратів та кисломолочного продукту впроваджено на Державному дослідному підприємстві бактеріальних заквасок ТІММ та на молочних заводах України (м. Лубни, м. Макаров, м. Суми, м. Жидачів). Економічний ефект від впровадження біотехнології препаратів становить 400 порцій в рік загальною вартістю 6300 грн. Апробація бактеріальних препаратів у клінічних умовах показала істотний соціальний ефект від їх застосування як додаткових засобів для профілактики та лікування кишкового дисбактеріозу, корекції стану мікробного ценозу верхніх дихальних шляхів людей.

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі літературних даних із проблеми, визначенні актуального напряму досліджень, організації та виконанні експериментальних досліджень у лабораторних та дослідно-промислових умовах, узагальненні одержаних результатів, статистичній обробці даних, розробці біотехнології бактеріальних препаратів і окремих етапів технології продукту. Здобувач брав безпосередню участь у розробці нормативної документації, апробації та впровадженні розробленої біотехнології, написанні наукових статей та патентів на винаходи.

Аналіз та обговорення результатів досліджень, формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником д.т.н. Н.Ф. Кігель. Окремі фрагменти роботи виконано разом з к.б.н. О.М. Рожанською (мікробіологічні дослідження), ТІММ УААН; к.б.н. В.В. Лук'янчуком (регенерація протопластів), ІМВ НАНУ; к.б.н. Н.Л. Зубковою (адгезія до клітинної лінії НЕР-2), НДІЕІХ АМНУ, які є співавторами робіт. Технологічні параметри виробництва напоїв визначено спільно з Л.А. Млечко, ТІММ УААН.

Особистий внесок здобувача підтверджується поданими документами і науковими працями.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на 1-й Всеукраїнській конференції молодих вчених-аграріїв “Роль молодих вчених в реформуванні аграрного сектору

економіки України” (Київ, НАУ, 2001р.); 7-й Міжнародній науково-технічній конференції “Пріоритетні напрями впровадження в харчову промисловість сучасних технологій, обладнання і нових видів продуктів оздоровчого та спеціального призначення” (Київ, УДУХТ, 2001р.) та 67-й, 69-й наукових конференціях молодих вчених, аспірантів і студентів (Київ, УДУХТ, 2001р., 2003р.), Міжнародній науково-технічній конференції „Розроблення та виробництво продуктів функціонального харчування, інноваційні технології та конструювання обладнання для перероблення сільгоспсировини, культура харчування населення України” (Київ, НУХТ, 2003р.)

Публікації результатів дисертаційної роботи включають 8 статей у фахових наукових журналах, 2 деклараційні патенти, 1 заявку на винахід, тези 4 наукових конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 131 сторінці і складається з вступу, огляду літератури, 3 розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел (218 найменувань) та додатків. Дисертація ілюстрована 35 таблицями та 29 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність обраної теми, визначено її мету та основні задачі, показано наукову новизну та практичне застосування одержаних результатів, наведено відомості стосовно особистого внеску автора, апробації результатів дисертації, обсягу роботи.

У першому розділі “Огляд літератури” узагальнено дані сучасної наукової та патентної інформації з питань біотехнології бактеріальних препаратів для ферментованих молочних продуктів функціональної дії, розглянуто методи селекції молочнокислих бактерій за критеріями функціональної активності та технологічності; здійснено аналіз літературних джерел щодо використання генетичних методів для одержання штамів молочнокислих бактерій із завданими властивостями. Висвітлено основні тенденції розвитку біотехнологій кисломолочних продуктів, розглянуто властивості та переваги функціональних кисломолочних продуктів, простежено дані щодо технологічних засобів, які дозволяють подовжити термін зберігання ферментованих молочних продуктів. Проведено аналіз стану ринку бактеріальних препаратів для кисломолочних напоїв функціонального харчування за кордоном і в Україні. Визначено пріоритетні напрями розробки біотехнологій заквашувальних бактеріальних препаратів, показано перспективність залучення до їх складу біологічно активної культури *L. casei*.

У другому розділі “Організація експериментальних досліджень” представлено схему проведення досліджень (рис. 1), дано стислу характеристику об’єктів і методів досліджень, якими користувалися при виконанні роботи. Ідентифікацію та селекційні дослідження штамів виконували за „Определителем бактерий Берджи” (1997) та рекомендаціями Л.А. Баннікової (1975). Аналіз

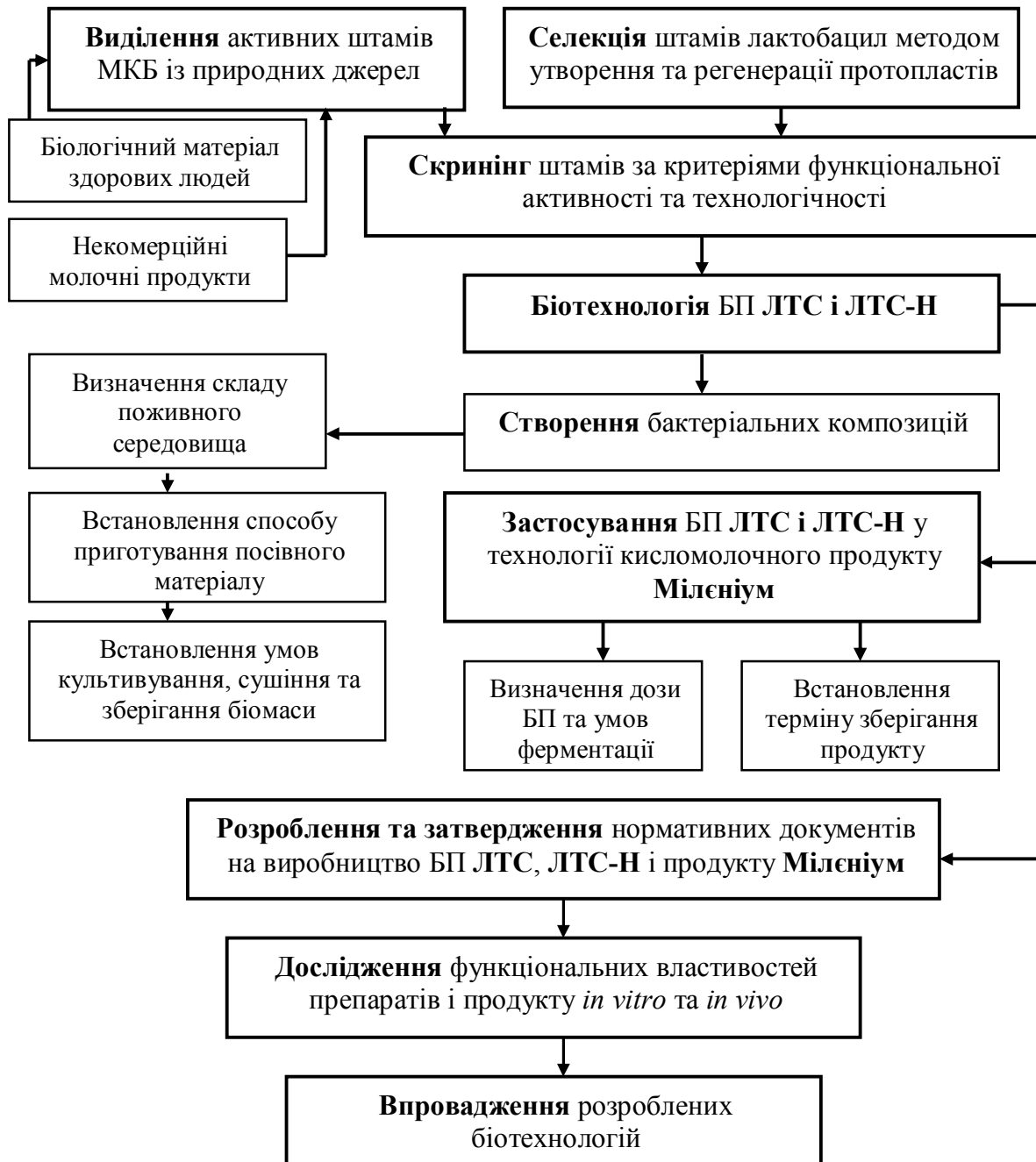


Рис. 1. Схема проведення експериментальних досліджень.
МКБ - молочнокислі бактерії, БП – бактеріальний препарат

мікропрепаратів чистих культур здійснювали із застосуванням світлового мікроскопу Motic (Fischer Bioblock) із вмонтованою відеокамерою TopView (програма Motic Images 2000); утворення протопластів клітин контролювали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Визначення мікробіологічних, органолептичних характеристик проводили загальноживими методами; активність β -галактозидази визначали за реакцією зі специфічним субстратом – о-нітрофеніл- β -D-галактопіранозидом (Некман, 1992); вуглеводний склад - методом високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі LC-5 Shimadzu;

нагромадження розчинних продуктів протеолізу – стандартними колориметричними методами на фотоелектроколориметрі КФК-3; амінокислотний склад - на аналізаторі 2000 Біотронік; в'язкість - на реовіскозиметрі Гепплера. Гідрофобність клітин молочнокислих бактерій визначали у біфазній системі “суспензія мікроорганізмів:н-гексадекан” (Rosenberg *et al.*, 1980). Жовчостійкість штамів оцінювали з використанням сухого препарату жовчі “Oxgall”, Sigma (Klaver *et al.*, 1993), холестеразну активність – за (Кейтс, 1975). Розрахунок параметрів росту бактерій у періодичній культурі – за (Шлегель, 1987). Графічну обробку результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel 7.0 та Harvard Chart XL for Windows 95 Version 2.0. Всі досліди проводили не менше, ніж у трьох повторностях, математичну обробку результатів здійснювали за методами варіаційної статистики (Ланач та ін., 2001).

У третьому розділі “Селекція молочнокислих бактерій за критеріями функціональної активності та технологічності” наведено результати власних досліджень відносно цілеспрямованої селекції молочнокислих бактерій з високою біологічною активністю для забезпечення біотехнологій бактеріальних препаратів та функціональних кисломолочних продуктів. Пошук штамів проводили за двома напрямками: по-перше, за допомогою традиційних мікробіологічних методів виділення чистих культур мікроорганізмів із біологічного матеріалу, отриманого від здорових людей та з некомерційних молочних продуктів; по-друге, шляхом застосування техніки одержання та регенерації протопластів клітин. Дослідження біологічних властивостей виділених культур здійснювали *in vitro* за критеріями, що дозволяють оцінити функціональний потенціал штамів, а саме: жовчо- і кислоторезистентністю, антагоністичною та адгезивною активностями, здатністю знижувати вміст холестерину. Технологічну придатність культур визначали за показниками активності зсідання молока, енергії кислотоутворення, активності β -галактозидази, здатності до зброджування вуглеводів, протеолітичної активності та фагостійкості.

Як результат, було ізольовано 289 культур із вмісту кишечника і 205 – з молочних продуктів. Первиний скринінг ізолятів показав, що ацидофільні культури характеризувалися високим рівнем енергії кислотоутворення, що обумовило необхідність селекції *L. acidophilus* у напрямку зниження цього показника із застосуванням сучасної техніки модифікації штамів. Було встановлено оптимальні умови для одержання та регенерації протопластів штаму *L. acidophilus* 35: літичний буфер (ацетатний), осмотичний стабілізатор (0,5 М сахароза, рН 7,0), концентрація літичного фактору (лізоцим, 50 мкг/см³), тривалість обробки (5 год). Для забезпечення ефективної реверсії протопластів до стану вихідних клітин було опрацьовано склад гіпертонічного середовища для регенерації, до якого залучили сахарозу, солі MgCl₂ і CaCl₂ та желатину. Частота регенерації у ньому становила 5,5 %. Цей біотехнологічний прийом забезпечив розширення діапазону природної мінливості штаму *L. acidophilus* 35 майже в 2

рази, причому 70 % ревертантів мали нижчу енергію кислотоутворення ніж вихідний штам.

На підставі результатів дослідження біологічних властивостей штамів, одержаних методами традиційної та сучасної селекції, було відібрано перспективні для функціональних продуктів молочнокислі бактерії *L. casei* ssp. *casei* 302, *L. acidophilus* 35 і 21 та *S. salivarius* ssp. *thermophilus* 21. Штами характеризувались гомогенною популяцією клітин (коефіцієнти варіації менше 10 %) і високим біотехнологічним і функціональним потенціалом (табл. 1).

Таблиця 1

Основні показники біотехнологічної та функціональної активності селекціонованих штамів молочнокислих бактерій

Показник	<i>L. casei</i> 302	<i>L. acidophilus</i> 35	<i>L. acidophilus</i> 21	<i>S. thermophilus</i> 21
Чисельність у молоці, lg КУО/см ³	7,85-8,25	8,20-8,47	7,95-8,03	8,34-8,50
Зниження вмісту лактози, % ^{*)}	25,6-26,7	28,6-31,1	22,0-23,9	26,3 -25,5
Межа кислотоутворення, °T	170±5	210±5	160±5	110±5
Фагостійкість	+	+	+	+
Жовчостійкість, K _{інг} , %	0,89-0,92	0,75-0,88	0,76-0,84	0,60-0,66
Кислоторезистентність, %	78-81	65-70	66-70	52-56
Адгезія до Нер-2, IA	1,43±0,24	0,36±0,18	9,89±1,05	0,99±0,14
Зниження рівня холестерину, % ^{*)}	58,6-64,0	21,2-25,8	22,3-26,1	28,9-35,4
Антагоністична активність, зона відсутності росту тест-культур у мм				
<i>Escherichia coli</i> 0113	28±1	18±1	19±1	12±1
<i>Proteus vulgaris</i> 2029	30±1	20±2	18±2	10±1
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	30±1	12±1	12±1	7±1
<i>Enterococcus cloaceae</i>	30±1	19±1	18±1	10±1
<i>Shigella sonnei</i> 12S	30±1	10±1	10±1	9±1

Примітки: *) - від вихідного вмісту. Результати достовірні при $p=0,05$

Культури вирізнялись, насамперед, стійкістю до агресивних сполук кишкового тракту, високою здатністю до адгезії і антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, фагостійкістю, здатністю активно рости та знижувати рівень лактози та холестерину за ферментації молока. Штам *L. casei* ssp. *casei* 302 характеризувався найвищою антагоністичною активністю (зони відсутності росту тест-культур 28-30 мм). Він також вирізнявся високим рівнем холестеразної активності, вилучав із середовища у 2 рази більше холестерину ніж відомий пробіотик *L. casei* за (Brashears et al., 1998). Штам *L. acidophilus* 21, який було отримано методом протопластування та регенерації,

характеризувався зниженим на 21 % рівнем енергії кислотоутворення та підвищеною здатністю до адгезії (у 25 разів порівняно до вихідного штаму *L. acidophilus* 35) (див. табл. 1, рис. 2).

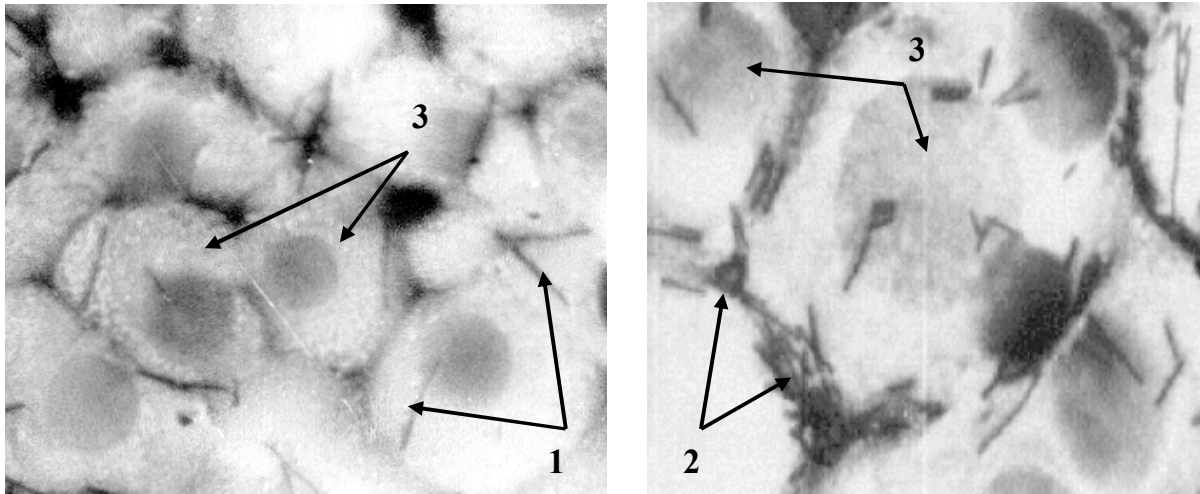


Рис. 2. Адгезія молочнокислих бактерій до клітинної лінії аденокарциноми гортані людини HEp-2.

1 - *L. acidophilus* 35; 2 - *L. acidophilus* 21; 3 - HEp-2 (світловий мікроскоп, збільшення 1×100)

У цьому розділі також досліджено динаміку розвитку відібраних штамів молочнокислих бактерій у молоці, визначено основні кінетичні параметри росту, ступінь гідролізу лактози, інтенсивність і специфічність дії протеолітичної активності бактерій. Отримані результати встановили значний біотехнологічний потенціал відібраних культур, здатний забезпечити стабільність перебігу технологічного процесу виробництва та необхідні характеристики бактеріальних препаратів і ферментованих ними продуктів.

У четвертому розділі „Розробка біотехнології бактеріальних препаратів із залученням *Lactobacillus casei* ssp. *casei* для функціональних молочних напоїв” подано результати щодо створення ефективних бактеріальних композицій з відібраними та селекціонованими біологічно активними штамми молочнокислих бактерій, визначено технологічні операції та параметри виготовлення і зберігання бактеріальних препаратів ЛТС і ЛТС-Н, досліджено закономірності функціонування ЛТС і ЛТС-Н як препаратів прямого внесення у різних молочних основах, визначено галузь і спосіб їх застосування, проведено перевірку функціональної активності бактеріальних препаратів у дослідях *in vitro* та *in vivo*, розраховано економічну ефективність виробництва розроблених бактеріальних препаратів.

Ключовими етапами розробки біотехнології бактеріальних препаратів були: створення бактеріальної композиції мікроорганізмів з високим рівнем біологічної активності, підбір оптимального складу поживного середовища з урахуванням фізіологічних потреб кожного компоненту, визначення способу приготування посівного матеріалу, опрацювання умов культивування молочнокислих бактерій та

режимів ліофільного сушіння, що забезпечують максимальну концентрацію біомаси та збереження її біологічної активності впродовж технологічного циклу виробництва та зберігання.

Для забезпечення необхідного рівня функціональної активності та технологічних властивостей, бактеріальні композиції створювали, поєднуючи мікроорганізми, виділені з різних природних джерел (так званого „кишкового” та “молочного” походження) з урахуванням їх сумісності та синергізму. Було проаналізовано низку композицій на основі двох і трьох видів селекціонованих штамів із поступовим збільшенням частки штаму *L. casei* ssp. *casei*. Встановлено, що наявність у складі бактеріальних композицій лише “кишкових” штамів (*L. casei* ssp. *casei* і *L. acidophilus*) не забезпечувала бажаної консистенції та смаку ферментованого молока. Поєднання цих бактерій з традиційним “молочним” штамом (*S. salivarius* ssp. *thermophilus*) покращило органолептику та реологічні характеристики кисломолочного згустку.

На підставі аналізу сукупності мікробіологічних, біохімічних та фізико-хімічних показників, остаточно було відібрано 2 бактеріальні композиції – ЛТС і ЛТС-Н, які містили молочнокислі бактерії видів: *L. casei* ssp. *casei*, *L. acidophilus* і *S. salivarius* ssp. *thermophilus*. Ці композиції забезпечували необхідні характеристики ферментованого ними молока, а саме: молокозсідальну активність ($5,5 \pm 0,5$) год, кислотність (70 ± 2) °Т, знижений вміст лактози (залишкова концентрація - $18,5 \div 19,5$ мг/см³) і вищий вміст вільних амінокислот (приріст майже вдвічі порівняно з вихідним молоком), приємний кисломолочний смак та щільну консистенцію. Загальна чисельність молочнокислих бактерій становила $1,0 \times 10^9$ КУО/см³, частка штаму *L. casei* ssp. *casei* - не менше 30-35 %. Така висока кількість біологічно активної мікрофлори задовольняла вимоги до функціональних продуктів.

Опрацювання оптимальних умов для промислового культивування бактеріальних композицій ЛТС і ЛТС-Н, компоненти яких розрізняються за ростовими параметрами, передбачало вирішення технологічних питань, які б за умов їх спільного вирощування забезпечили високу концентрацію молочнокислих бактерій, збереження співвідношення між складниками композицій та біохімічної активності культур. На основі експериментальних даних було підібрано поживне середовище, до складу якого залучили: 1% сухого знежиреного молока, 0,7% пептону, по 1% лактози та глюкози, 0,5% оцтовокислого натрію, 0,3% лимоннокислого натрію, 0,02% магнію сірчанокислого, 0,005% марганцю сірчанокислого, 0,5% дріжджового екстракту як стимулятора росту лактобацил, 0,05% аскорбінової кислоти як антиоксиданта та 0,1% твін 80 як піногасника.

Експериментально визначено, що для узгодження росту складників композицій посівний матеріал штамів необхідно готувати наступним чином: *L. casei* ssp. *casei* 302 і *L. acidophilus* 21 - у МРС із додаванням по 1 % лактози та глюкози (рН 6,5), а *L. acidophilus* 35 та *S. salivarius* ssp. *thermophilus* 21 – у 10 %

відновленому сухому знежиреному молоці.

Показано, що інтенсивність росту бактерій залежить від кількості інокуляту і співвідношення між штамми у ньому. Максимальна концентрація мікроорганізмів накопичувалась у разі внесення 5 % посівного матеріалу від об'єму середовища за співвідношення між складниками як 1:1:1. У такий спосіб приготування інокуляту разом зі стабілізацією кислотності культуральної рідини на експериментально визначеному рівні ($6,5 \pm 0,1$) од рН досягали необхідного збільшення чисельності бактеріальних культур ЛТС і ЛТС-Н, відповідно – у 224 і 195 рази (рис. 3).

На підставі розрахунку параметрів росту ЛТС і ЛТС-Н за сухою біомасою було встановлено: після короткої лаг-фази (T_l менше 1,5 год) культури переходили до активного росту з максимальною питомою швидкістю росту на 4-6 год культивування - $\mu_{max} = 0,82$ і $0,81 \text{ год}^{-1}$, та досягали максимального рівня біомаси на 12 год – $X_{max} = 2,15$ і $1,80 \text{ мг/см}^3$, відповідно для ЛТС і ЛТС-Н.

Цьому періоду відповідало майже повне вичерпання лактози і глюкози середовища та поступове накопичення вільних амінокислот (рис. 4).

Економічний коефіцієнт становив, відповідно для ЛТС і ЛТС-Н: $Y = 0,12$, $Y = 0,11$.

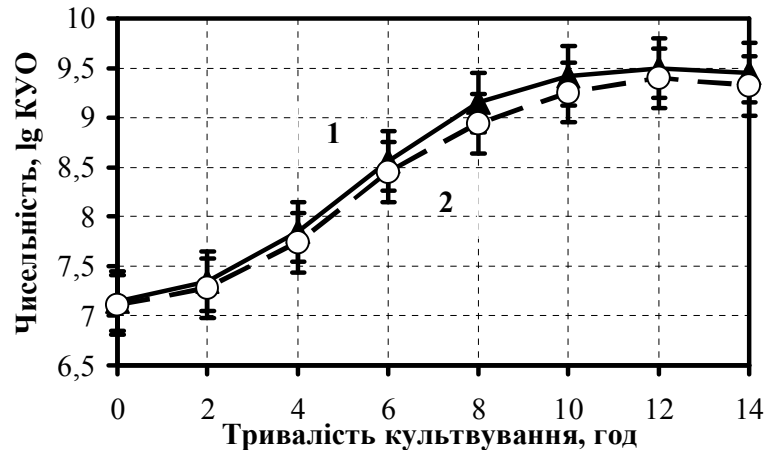


Рис. 3. Динаміка росту бактеріальних культур.
1 - ЛТС , 2 - ЛТС-Н

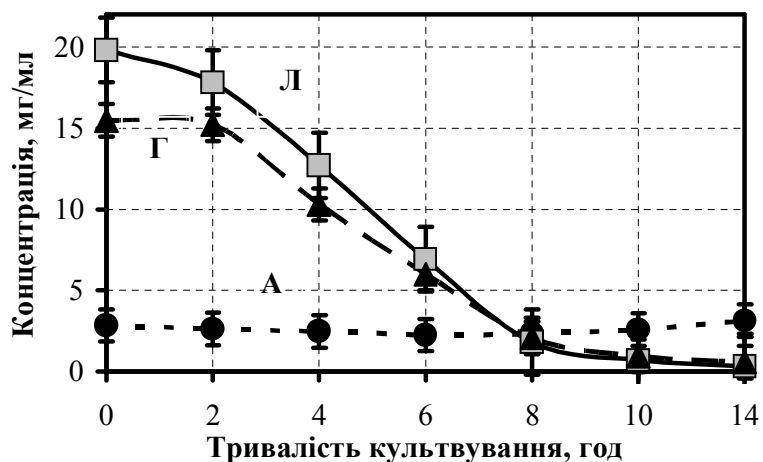


Рис. 4. Динаміка використання складових поживного середовища.

Л - лактоза; Г – глюкоза; А - вільні амінокислоти

Одержану біомасу (БМ) після відокремлення від культуральної рідини на суперцентрифугі при 15000 об/хв змішували зі спеціально розробленим захисним

середовищем (ЗС), що містило сахарозу, цитрат натрію та сухе знежирене молоко (вміст сухих речовин 30 %) у співвідношенні БМ до ЗС як 1:1 – 1:3.

Суспензії бактеріальних клітин заморожували і сушили методом сублимації протягом (18 ± 2) год за таких режимів: початок сушіння - мінус (25 ± 2) °С, закінчення – плюс (36 ± 2) °С. Використання концентрованого захисного середовища та визначених режимів забезпечувало виживання 96-98 % клітин бактеріальних препаратів, в тому числі 95-96 % лактобацил *L. casei* ssp. *casei* і *L. acidophilus*.

Отримані бактеріальні препарати з масовою часткою вологи не більше 5 % були стабільними протягом 6 місяців за температури $(2-6)$ °С та 12 місяців за – мінус $(18-20)$ °С. За цей термін втрачалось лише 5-12 % від вихідної кількості мікроорганізмів (рис. 5), що істотно не впливало на функціональні та технологічні властивості бактеріальних препаратів.

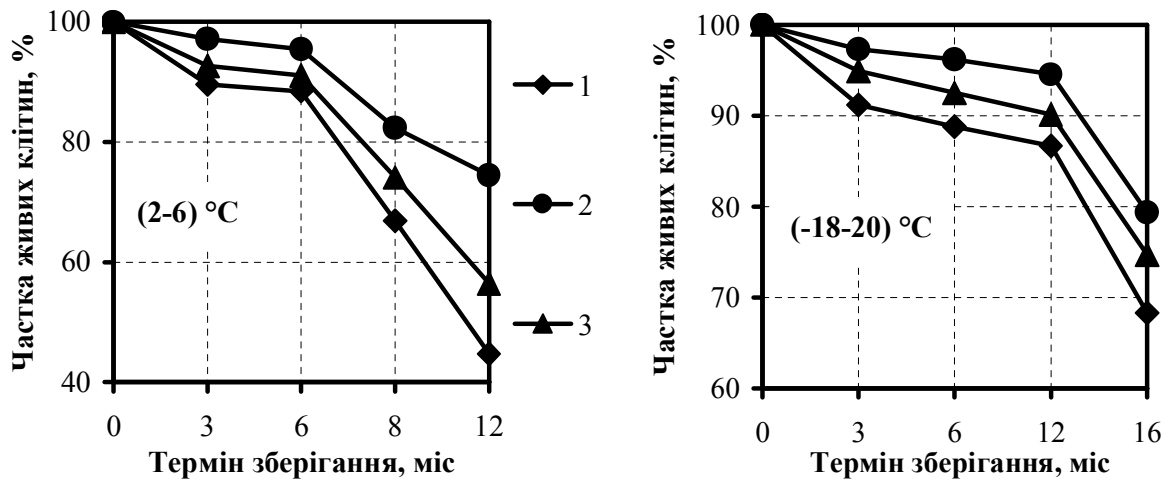


Рис. 5. Вплив температурних режимів зберігання на життєздатність молочнокислих бактерій за різного співвідношення біомаси до захисного середовища.

Співвідношення біомаси до захисного середовища: 1 - 1:1; 2 - 1:2; 3 - 1:3

Розроблена біотехнологія забезпечує вихід бактеріальних препаратів на рівні 8-9 г/дм³, що містять у 1 г до $4,1 \times 10^{11}$ КУО біологічно активної мікрофлори, в тому числі бактерій *L. casei* ssp. *casei* - не менше $1,0 \times 10^{11}$ КУО. Така їх кількість є гарантом функціональної активності препаратів і продуктів з їх застосуванням. Експериментально було підтверджено, що препарати зберегли високу антагоністичну активність - мінімальна бактерицидна доза для *E. coli*, *Ent. cloacae*, *P. vulgaris* та *S. aureus* становила 1-5 мг/см³. Отримані бактеріальні препарати відповідали вимогам до препаратів прямого внесення, а саме: характеризувалися високою розчинністю (індекс розчинності - 0,4 см³ сирого осаду) та активністю згортання молока (при внесенні 1 г/дм³) - 6,0-6,5 год.

Основним призначенням новостворених бактеріальних препаратів ЛТС та

ЛТС-Н, є використання їх як заквашувальних препаратів у виробництві функціонального кисломолочного напою Міленіум. Експериментально було встановлено основні параметри ферментаційного процесу – дозу заквашувального препарату (5 г/т молочної основи), температуру (36-37 °С), тривалість (7-8 год) та кислотність молочної згустку (70-75 °Т). З урахуванням фізіологічних потреб заквашувальної мікрофлори було опрацьовано рецептуру молочної суміші, яка здатна забезпечити не тільки бажаний перебіг ферментації, а й необхідні дієтичні та функціональні параметри та відмінну органолептику готового напою. Він виробляється з нормалізованої гомогенізованої пастеризованої суміші молока, ферментованої бактеріальним препаратом з додаванням або без додавання наповнювачів. Технологія виробництва передбачає одержання продукту як резервуарним, так і термостатним способами з використанням типових ліній та обладнання, що застосовуються у виробництві кисломолочних продуктів. Готовий напій має щільну, однорідну консистенцію, чистий кисломолочний або фруктовий смак (в залежності від наповнювача) і приємний аромат.

Продукти, вироблені із застосуванням заквашувальних бактеріальних препаратів ЛТС і ЛТС-Н, характеризувалися високими мікробіологічними показниками - $(1,4\div 1,5)\times 10^9$ КУО/г активної мікрофлори та біохімічними характеристиками - містили на 35 % і 38 % менше, відповідно лактози і холестерину та в 2,5 рази більше вільних амінокислот (15 % із них незамінні) порівняно до вихідної молочної основи. При зберіганні за температури (2-6)°С продукти характеризувалися стабільними фізико-хімічними та біохімічними властивостями впродовж тривалого терміну (табл. 2).

Таблиця 2

Зміна фізико-хімічних і біохімічних показників кисломолочного напою Міленіум при зберіганні
(1 – ферментація ЛТС, 2 – ферментація ЛТС-Н)

Показник		Термін зберігання, доба			
		1	5	14	18
В'язкість, <i>Па·с</i> × 10 ⁻³	1	0,24±0,02	0,24±0,02	0,20±0,01	0,15±0,01
	2	0,25±0,02	0,25±0,01	0,24±0,02	0,23±0,02
Вміст лактози, % від вихідного	1	64,7	61,7	58,8	57,9
	2	65,1	62,6	61,1	60,2
Вміст холестерину, % від вихідного	1	61,10	61,05	60,89	60,89
	2	62,30	62,15	62,14	61,95

Встановлено, що продуктам притаманна антимікробна активність щодо збудників кишкових інфекцій, яка не зменшувалась впродовж досліджуваного

терміну зберігання – зони відсутності росту знаходились у межах від 13 до 24 мм в залежності від використаної тест-культури.

У напої, виготовленому із застосуванням ЛТС, після 7 діб зберігання спостерігали поступове збільшення кислотності, тоді як у варіанті з ЛТС-Н, що містив штам *L. acidophilus* 21 з низькою межею кислотоутворення, функціональні і технологічні характеристики були стабільними впродовж 18 діб (табл. 2, рис. 6).

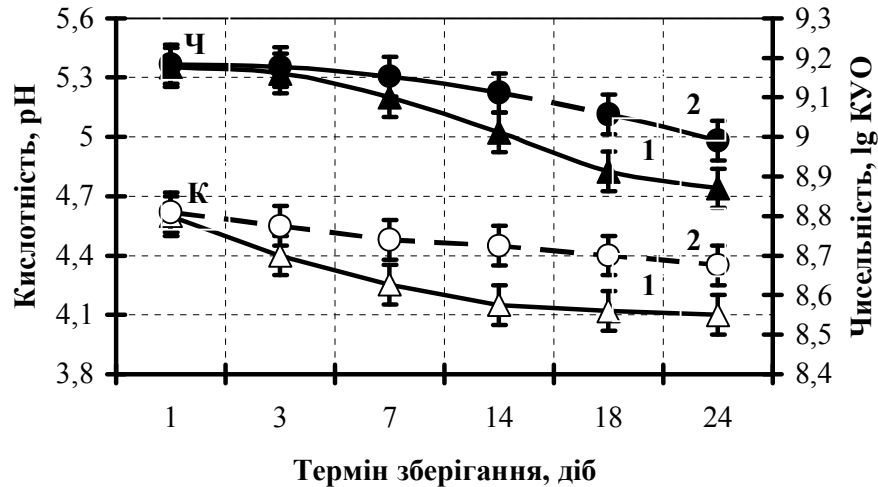


Рис. 6. Динаміка вмісту молочнокислих бактерій та активної кислотності кисломолочного напою Міленіум під час зберігання.

Ч – чисельність, К – кислотність, 1- ферментація ЛТС; 2 – ферментація ЛТС-Н

На підставі цих результатів було встановлено гарантований термін зберігання напоїв, вироблених із бактеріальним препаратом ЛТС у 5 діб, та ЛТС-Н - у 14 діб.

Промислова перевірка бактеріальних препаратів ЛТС і ЛТС-Н показала їх придатність до використання як препаратів прямого внесення, забезпечення високої якості продукції та відповідності вимогам нормативної документації.

Високий рівень антимікробної активності бактеріальних препаратів, встановлений *in vitro*, було підтверджено *in vivo* у доклінічних випробуваннях на моделі лабораторних мишей та у клінічних умовах, встановлено ефективність застосування бактеріальних концентратів ЛТС і ЛТС-Н як додаткових засобів для профілактики дисбактеріозів. Кисломолочний напій Міленіум рекомендовано МОЗ України як профілактичний засіб для нормалізації кишкової мікрофлори, обміну холестерину та покращення процесів травлення.

ВИСНОВКИ

1. Створено першу вітчизняну біотехнологію заквашувальних бактеріальних препаратів для виробництва функціональних ферментованих продуктів із використанням біологічно активної культури *L. casei ssp. casei*.

2. Виділено з природних джерел і відібрано за критеріями функціональної

активності та технологічної придатності 3 промислово цінні штами молочнокислих бактерій *L. casei ssp. casei* 302, *L. acidophilus* 35 і *S. salivarius ssp. thermophilus* 21.

3. Теоретично обґрунтовано та запропоновано спосіб одержання штамів молочнокислих бактерій із завданими властивостями за допомогою техніки утворення та регенерації протопластів. Вперше, селекціоновано штам ацидофільної палички зі зниженою енергією кислотоутворення та підвищеною здатністю до адгезії (деклараційний патент України № 64347 А).

4. Встановлено технологічні етапи, параметри та режими виготовлення, сушіння і зберігання бактеріальних препаратів ЛТС і ЛТС-Н. Розроблена технологія дозволяє одержувати з 1 дм³ поживного середовища до 9 г препарату, у 1 г якого міститься 300 млрд. КУО біологічно активних молочнокислих бактерій, в тому числі не менше 100 млрд. КУО виду *L. casei ssp. casei* з підвищеною антагоністичною та холестеразною активностями (деклараційний патент України № 56385 А).

5. Встановлено, що використання бактеріального препарату ЛТС у виробництві кисломолочного напою Міленіум, забезпечує його функціональну активність. За комплексом мікробіологічних, антагоністичних і біохімічних властивостей Міленіум віднесено до продуктів лікувально-профілактичного харчування (висновок МОЗ України № 5.08.07/5368 від 12.12.2000).

6. Визначено, що залучення штаму ацидофільної палички зі зниженою енергією кислотоутворення до складу заквашувального бактеріального препарату ЛТС-Н, дозволяє подовжити гарантований термін зберігання кисломолочного напою Міленіум до 14 діб (висновок МОЗ України № 05.03.02-06/28960 від 14.07.2003).

7. Проведено апробацію розробленої біотехнології бактеріальних препаратів ЛТС і ЛТС-Н у промислових умовах на молочних заводах України, яка підтвердила придатність їх до застосування у виробництві кисломолочних продуктів як препаратів прямого внесення. Розроблено та затверджено відповідні нормативні документи, якість препаратів підтверджено актами впровадження. Економічний ефект від впровадження біотехнології препаратів становить 400 порцій в рік загальною вартістю 6300 грн. Очікуваний економічний ефект прогнозується на рівні 1 тис. порцій в рік загальною вартістю близько 16 тис. грн.

8. Показано у лабораторних і клінічних умовах ефективність застосування новостворених бактеріальних препаратів як додаткових засобів до основної терапії у нормалізації кишкового мікробного ценозу та корекції стану піднебінних мигдаликів людини. Соціальний ефект від впровадження розроблених препаратів і напою полягає в розширенні асортименту функціональних кисломолочних продуктів, спрямованих на поліпшення загального стану здоров'я людей та лікування і профілактику дисбактеріозів різних ступенів та етіології.

Перелік публікацій за темою дисертаційної роботи

1. Ересько Г.А., Кігель Н.Ф., Седина С.А., Науменко О.В., Лукьянчук В.А., Мацелюх Б.П. Получение протопластов стартовых культур лакто- и бифидобактерий с использованием лизоцима для селекции промышленных штаммов // Вісник аграрної науки. –1999. - №10. - С. 66-68.

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі даних літератури, проведенні експериментальних досліджень з визначення оптимальних умов одержання та регенерації протопластів молочнокислих бактерій з колекції ТІММ.

2. Науменко О.В., Кігель Н.Ф. Вплив протопластування на пасажну мінливість біотехнологічних властивостей *Lactobacillus acidophilus* 20у та *Bifidobacterium longum* 35 // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2002. - № 40. – С. 189-193.

Особистий внесок здобувача полягає в дослідженні популяційної структури вихідного штаму *L. acidophilus*, мінливості його регенерантів впродовж послідовних пересівів; селекції штамів лактобацил у напрямку зниження енергії кислотоутворення; проведенні статистичної обробки та узагальненні одержаних результатів; підготовці матеріалів до друку.

3. Кігель Н.Ф., Рожанська О.М., Науменко О.В. Дослідження *in vitro* холестеразної активності лакто- і бифідобактерій як критерій відбору пробіотичних штамів // Вісник аграрної науки. – 2002. - № 8. - С. 59-62.

Особистий внесок здобувача полягає в проведенні експериментальних досліджень жовчостійкості молочнокислих бактерій та визначенні впливу мікроорганізмів на вміст холестерину під час їхнього росту в молоці.

4. Кігель Н.Ф., Науменко О.В., Зубкова Н.М. Гідрофобність й адгезивні властивості деяких штамів промислових молочнокислих бактерій // Вісник аграрної науки. – 2003. - № 5. – С. 61-65.

Особистий внесок здобувача полягає в опрацюванні літературних даних з теми, вивченні здатності до адгезії молочнокислих бактерій до гідрофільної поверхні (скляні гранули), гідрофобної поверхні (суспензія мікроорганізмів:н-гексадекан) та до клітинної лінії НЕр-2.

5. Науменко О.В., Зубкова Н.Л., Кігель Н.Ф. Доклінічне випробування пробіотичного препарату “ЛТС” в дослідах *in vivo* на моделі лабораторних мишей // Вісник аграрної науки. – 2002. - № 5. - С. 28-32.

Особистий внесок здобувача полягає в плануванні та виконанні досліджень біологічної активності препарату ЛТС у дослідах *in vitro* та *in vivo*, проведенні бактеріологічного дослідження випорожнень тварин, обробці отриманих даних з використанням статистичних методів, підготовці матеріалів до друку.

6. Науменко О.В., Рожанська О.М., Кігель Н.Ф. Препарат нового покоління // Харчова і переробна промисловість. – 2003. - № 3. – С. 21-22.

Особистий внесок здобувача полягає в узагальненні одержаних

експериментальних результатів, визначенні технологічних параметрів виробництва бактеріального препарату ЛТС, розробці нормативної документації, підготовці матеріалів до друку.

7. Науменко О.В., Жукова Я.Ф., Насирова Г.Ф., Кігель Н.Ф. Вплив терміну зберігання на властивості функціональних молочних продуктів // Молочна промисловість. – 2003. - № 2 (5). – С. 34-36.

Особистий внесок здобувача полягає в дослідженні мікробіологічних, біохімічних, фізико-хімічних та антагоністичних властивостей кисломолочних продуктів у процесі виробництва та протягом зберігання; узагальненні та систематизації одержаних даних; підготовці матеріалів до друку.

8. Науменко О.В., Рожанська О.М., Кігель Н.Ф., Бережницька Т.Г. Вивчення клінічної ефективності застосування бактеріального препарату „ЛТС” // Молочна промисловість. – 2003. - № 4 (7). – С. 20-22.

Особистий внесок здобувача полягає в приготуванні бактеріального препарату ЛТС гарантованої якості відповідно до ТУ У 46.39 ГО 312-2000; обробці результатів дослідження ефективності застосування препарату в клінічних умовах; підготовці матеріалів до друку.

9. Деклараційний патент 56385 А Україна, МКИ 7 С 12N 1/20, А 23С 9/12 Спосіб одержання бактеріального концентрату прямого внесення для продуктів спеціального призначення / Єресько Г.О., Науменко О.В., Рожанська О.М., Ушакова В.В., Кігель Н.Ф. – Заявлено 05.11.01; Опубл. 15.05.03, Бюл. № 5.

Особистий внесок здобувача полягає в узагальненні та систематизації літературних та власних експериментальних даних та оформленні заявки на патент.

10. Деклараційний патент 64347 А Україна, МКИ 7 С 12N 1/20, А 23С 9/12 Штам бактерій *Lactobacillus acidophilus*, що використовується у виробництві бактеріальних препаратів та функціональних молочних продуктів / Єресько Г.О., Науменко О.В., Кігель Н.Ф. – Заявлено 19.05.03; Опубл. 16.02.04, Бюл. № 2.

Особистий внесок здобувача полягає в проведенні літературного та патентного пошуку, узагальненні та систематизації одержаних експериментальних даних, оформленні заявки на патент.

11. Заявка № 2004032040 А Україна, МКИ 7 С 12N 1/20, А 23С 9/12 Штам бактерій *Lactobacillus casei* ssp. *casei* ІМВ В-7017, що використовується у виробництві бактеріальних препаратів та функціональних молочних продуктів / Науменко О.В., Рожанська О.М., Кігель Н.Ф. – Заявлено 19.03.04.

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі літературних даних, проведенні патентного пошуку, узагальненні та систематизації власних експериментальних даних, оформленні заявки на патент.

12. Науменко О.В., Рожанська О.М., Ушакова В.В., Кігель Н.Ф. Технологія пробіотичної заквашувальної культури “ЛТС” для ферментованого кисломолочного продукту // Матеріали VII Міжн. наук.-техн. конф. “Пріоритетні

напрями впровадження в харчову промисловість сучасних технологій, обладнання і нових видів продуктів оздоровчого та спеціального призначення” в збір. „Наукові праці Українського державного університету харчових технологій”. - Ч. 2. - К.: УДУХТ. - 2001. - №10. – С. 38-39.

Особистий внесок здобувача полягає в опрацюванні технологічних параметрів та режимів виробництва бактеріального препарату ЛТС у дослідно-промислових умовах, підготовці матеріалів до друку.

13. Науменко О.В., Кігель Н.Ф. Вивчення антагоністичної і холестеразної активностей лактобактерій, перспективних при створенні продуктів спеціального призначення // Матеріали конф. „67-а наук. конференція студентів, аспірантів і молодих вчених”. - Ч. 2. - К.: УДУХТ. – 2001. - С. 34.

Особистий внесок здобувача полягає в дослідженні антагоністичної активності молочнокислих бактерій, визначенні мінімальної бактерицидної дози препаратів, що містять ці мікроорганізми, вивченні здатності знижувати рівень холестерину *in vitro* бактеріями та препаратами, підготовці матеріалів до друку.

14. Науменко О.В., Зубкова Н.Л., Кігель Н.Ф. Метод визначення адгезивності лакто- та біфідобактерій // Матеріали конф. „69-а наук. конференція студентів, аспірантів та молодих вчених”. - Ч. 2. - К.: НУХТ. – 2003. – С. 40.

Особистий внесок здобувача полягає в розробці методу дослідження здатності до адгезії молочнокислих бактерій, підготовці матеріалів до друку.

15. Науменко О.В., Кігель Н.Ф. Розробка технології бактеріального концентрату „ЛТС-Н” для кисломолочного продукту тривалого зберігання // Матеріали Міжн. наук.-техн. конф. „Розроблення та виробництво продуктів функціонального харчування, інноваційні технології та конструювання обладнання для перероблення сільгоспсировини, культура харчування населення України”. - Харчова промисловість, додаток до № 3. – К.: НУХТ – 2004. – С. 73.

Особистий внесок здобувача полягає в дослідженні та опрацюванні у лабораторних та дослідно-промислових умовах технологічних режимів виготовлення заквашувального препарату ЛТС-Н, визначенні мікробіологічних та фізико-хімічних показників сухого препарату, підготовці матеріалів до друку.

АНОТАЦІЯ

НАУМЕНКО О.В. Розробка технології бактеріальних препаратів із залученням *Lactobacillus casei* ssp. *casei* для виробництва функціональних молочних напоїв. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет харчових технологій Міністерства освіти та науки України, Київ, 2005.

Дисертація присвячена науковому обґрунтуванню та розробці біотехнології бактеріальних препаратів із біологічно активними культурами молочнокислих бактерій для функціональних молочних напоїв.

Проведено цілеспрямований відбір з природних джерел штамів молочнокислих бактерій за критеріями функціональної активності та технологічності. Вперше застосовано техніку одержання та регенерації протопластів для селекції штаму лактобацил зі зниженою енергією кислотоутворення.

Створено нові для України бактеріальні композиції із залученням біологічно активної культури *L. casei* ssp. *casei*. Опрацьовано режими та параметри технологічного процесу виробництва бактеріальних препаратів ЛТС і ЛТС-Н для функціонального кисломолочного напою Міленіум. Досягнуто подовження гарантованого терміну придатності продукту Міленіум до 14 діб шляхом застосування селекціонованого штаму ацидофільної палички зі зниженою енергією кислотоутворення.

У лабораторних та клінічних дослідженнях доведено функціональну активність розроблених бактеріальних препаратів і ферментованих ними продуктів. Промислова апробація бактеріальних препаратів ЛТС і ЛТС-Н підтвердила їх придатність до використання як заквашувальних препаратів прямого внесення, забезпечення високої якості продукції та відповідності вимогам нормативної документації.

Ключові слова: біотехнологія, *L. casei* ssp. *casei*, селекція, протопласт, бактеріальний препарат, функціональний напій.

АННОТАЦІЯ

НАУМЕНКО О.В. Разработка технологии бактериальных препаратов с использованием *Lactobacillus casei* ssp. *casei* для производства функциональных молочных напитков. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный университет пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Киев, 2005.

Диссертация посвящена научному обоснованию и разработке биотехнологии бактериальных препаратов на основе биологически активных культур молочнокислых бактерий для функциональных молочных напитков.

В результате целенаправленной селекции по критериям функциональной активности и технологичности выделено 3 промышленно ценных штамма молочнокислых бактерий *L. casei* ssp. *casei* 302, *L. acidophilus* 35, *S. salivarius* ssp. *thermophilus* 21. Показано, что штамм *L. casei* ssp. *casei* 302, выделенный из кишечника человека, характеризуется повышенной антагонистической и холестеразной активностью. Впервые с помощью техники получения и регенерации протопластов селекционирован штамм *L. acidophilus* 21 с низкой энергией кислотообразования и высокими адгезионными свойствами.

Впервые в Украине созданы бактериальные композиции ЛТС и ЛТС-Н с использованием биологически активной культуры *L. casei* ssp. *casei*. Отработаны

режимы и параметры технологического процесса получения бактериальных препаратов прямого внесения ЛТС и ЛТС-Н. Разработанная биотехнология позволяет получать с 1 дм³ питательной среды до 9 г концентрата, в 1 г которого содержится $(2,0-4,1) \times 10^{11}$ КОЕ биологически активной микрофлоры, в том числе не менее $1,0 \times 10^{11}$ КОЕ *L. casei* ssp. *casei* 302.

Исследовано функционирование заквасочных препаратов ЛТС и ЛТС-Н при производстве кисломолочного напитка Миллениум. Экспериментально установлено, что оптимальная доза заквасочных препаратов составляет 5 г/т молочной основы, длительность процесса ферментации - 7-8 ч, а кислотность готового продукта - (70-75) °Т. Показано, что продукты характеризуются высокими микробиологическими и функциональными показателями. В них содержится $(1,4-1,5) \cdot 10^9$ КОЕ/г активной микрофлоры, на 35 % і 38 % меньше, соответственно, лактозы и холестерина и в 2,5 раза больше свободных аминокислот по сравнению с исходной молочной основой.

Исследованы изменения физико-химических, биохимических, микробиологических и органолептических показателей ферментированных молочных продуктов, выработанных с использованием бактериальных препаратов ЛТС и ЛТС-Н, в процессе их хранения. Установлено, что напиток, полученный с использованием бактериального препарата ЛТС-Н, в состав которого входит селекционированный штамм *L. acidophilus* 21 со сниженной энергией кислотообразования, характеризуется длительным сроком хранения – до 14 суток при температуре (2-6) °С.

Функциональная активность созданных бактериальных препаратов и продуктов подтверждена лабораторными и клиническими испытаниями. Новизна и оригинальность бактериальных культур, их композиций и биотехнология бактериальных препаратов, созданных при выполнении данной работы, защищены 2 патентами.

Ключевые слова: биотехнология, *L. casei* ssp. *casei*, селекция, протопласт бактериальный препарат, функциональный напиток.

SUMMARY

NAUMENKO O. V. Development of bacterial preparations technology using *Lactobacillus casei* ssp. *casei* for the production of functional milk drinks -The manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of technical science on a speciality - 03.00.20 - biotechnology. National University of food technologies, Ministry of education and science of Ukraine, Kiev, 2005.

The dissertation work is devoted to a scientific substantiation and to the development of bacterial preparations with biologically active lactic acid bacteria cultures biotechnology for functional milk drinks.

The sorting through lactobacteria strains (by criteria of functional activity and technological effectiveness) from natural sources was conducted. The technique of protoplasts getting and regeneration for the selection of lactobacillus cultures with reduced acidity energy was used for the first time.

New for Ukraine bacterial compositions using biologically active culture *L. casei* ssp. *casei* were created. Procedures and parameters of technological process of bacterial preparations LTS and LTS-N production for functional lactic acid drink Millenium were created. It was reached an extension of Millenium product shelf-life to 14 days by using selected acidophilus bacillus culture with reduced acidity energy. In laboratory and clinical studies it was proved functional activity of the developed bacterial preparations and products fermented by them. Industrial approbation of bacterial preparations LTS and LTS-N approved their suitability for use as preparations of direct insertion, for products high quality maintenance and their compliance with normative documentation requirements.

Key words: biotechnology, *L. casei* ssp. *casei*, selection, protoplast, bacterial preparation, functional drink.