

6. Рівіс Й. Ф. Кількісні методи хроматографічного визначення індивідуальних ліпідів і жирних кислот в біологічному матеріалі / Й. Ф. Рівіс, Р.С. Федорук // Львів: SPOCOM .– 2010.– 109 с.

References

- Taranov, G. F. (1986). Korma i kormlenie pchel / Rosselkhozizdat.– Moscow, 160. (in Russian).
Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen a revive of their importance for honey bees / Bee World. 82 (2), 60–75.
Dobson, H. E. M. (1988). Survey of pollen and pollenkitt lipids — chemical cues to flower visitors. American journal of botany. 75, 180– 182.
Bogdanov, S. (2003). Quality and Standards of Pollen and Beeswax / Apiacta. 38, №4, 334–341.
Louvo, J. (1977). Scientific and practical aspects of feeding bees. / the XXVI International Congress of beekeeping. – Adelaide, Australia. 367–371.
Rivis, J. F., Fedoruk, R. S. (2010). Kilkisni metody hromatografichnogo vyznachennya individualnyh lipidiv I girnyh kislot v biologichnomu materialі / Lviv: SPOLOM, 109. (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 15.04.2016

УДК 615.451.2

Капрельянц Л. В., д. т. н., професор (leonid@onaft.edu.ua)

Труфкати Л. В., к. т. н., доцент (trufkati@gmail.com)

Крупницька Л. О., аспірант (krupitskaja.lora@yandex.ua) ©

Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса, Україна

ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ПІДРАХУНКУ КІЛЬКОСТІ ЖИТТЄЗДАТНИХ КЛІТИН БІФІДОБАКТЕРІЙ У ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ ТА ПРЕПАРАТАХ ПРОБІОТИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ.

В даній експериментальній роботі досліджено можливість використання соєво–лактозного напіврідкого середовища з різним вмістом соєвої сироватки для підрахунку кількості життєздатних клітин біфідобактерій. За результатами досліджень були відібрані зразки лактозного середовища з додаванням від 3–5 % соєвої сироватки, які можна рекомендувати для контролю кількості клітин біфідобактерій відповідно у продуктах та біологічно–активних препаратах пробіотичного призначення, що використовуються в медицині для корекції та профілактики дисбактеріозів.

Ключові слова: *Bifidobacterium*, культивування, кількісний підрахунок, поживне середовище, соєва сироватка.

УДК 615.451.2

Капрельянц Л. В., д.т.н., професор, **Труфкати Л. В.**, к.т.н., доцент,

Крупницкая Л. А., аспірант

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса, Украина

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ПОДСЧЕТА КОЛИЧЕСТВА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК БИФИДОБАКТЕРИЙ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И ПРЕПАРАТАХ ПРОБИОТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В данной экспериментальной работе исследована возможность использования соево–лактозной полужидкой среды с различным содержанием соевой сыворотки для подсчета количества жизнеспособных клеток бифидобактерий. По результатам исследований были отобраны образцы лактозной среды с добавлением от 3–5 % соевой сыворотки, которые можно рекомендовать использовать как для контроля количества жизнеспособных бифидобактерий в продуктах питания, так для контроля биологически активных препаратов, используемых в медицине для коррекции и профилактики дисбактериозов.

© Капрельянц Л. В., Труфкати Л. В., Крупницька Л. О., 2016

Ключевые слова: *Bifidobacterium*, культивирование, количественный подсчет, питательную среду, соевая сыворотка.

UDC 615.451.2

Kaprelyants L. V., Doctor of Technical Sciences, Professor,
Trufkaki L. V., PhD, Assistant Professor, **Krupitskaya L. A.**, graduate student.
Odessa National Academy of Food Technologies, Odessa, Ukraine

THE NUTRIENT MEDIUM FOR COUNTING THE NUMBER OF VIABLE CELLS OF BIFIDOBACTERIA IN FOOD PRODUCTS AND PROBIOTIC DRUG USE

In this experimental work we explored the possibility of using soybean–lactase semi liquid medium with different contents of soybean whey to count the number viable cells of bifidobacteria. According to the research, we were selected samples lactose medium with the addition of 3–5%. It was recommended to use for control the amount for viable bifidobacteria in food and for control the biologically active supplements used in medicine for the prevention and correction of dysbacteriosis.

Key words: *Bifidobacterium*, cultivation, quantitative count, nutrient medium, soy whey.

Вступ. Майже у 90 % населення України відзначені порушення кількісного та якісного складу шлунково–кишкової мікрофлори, що позначаються термінами «дисбактеріоз» або «дисбіоз» [1].

Дисбактеріозами страждають пацієнти практично всіх стаціонарів і амбулаторних служб, жителі екологічно несприятливих регіонів, порушення нормальної мікрофлори яких формуються в результаті впливу на організм фізичних, хімічних, радіаційних та інших факторів [2].

Для відновлення порушеної мікрофлори людини використовують різноманітні прийомі, перш за все, введення у великих кількостях антагоністичних штамів бактерій – представників нормальної мікрофлори у складі пробіотичних препаратів або функціональних продуктів. Найменшими побічними ефектами при їх тривалому застосуванні володіють пробіотики, до складу яких входять біфідобактерії. Біфідобактерії є ефективним біокоректором, що володіє багатофакторним регулюючим і стимулюючим впливом на організм [3].

Відомо, що максимальний позитивний ефект на організм людини виявляють препарати і продукти харчування, що містять живі біфідобактерії у кількості від 10^8 КУО/см³ і більше. Саме кількісний вміст життєздатних біфідобактерій є основним показником якості препаратів і продуктів харчування пробіотичного призначення [4].

Існують методи мікробіологічного контролю продуктів лікувально–профілактичного призначення за кількістю життєздатних клітин біфідобактерій, які засновані на посіві досліджуваного матеріалу методом послідовних десятикратних розведень в ряд пробірок зі спеціальним поживним середовищем. При цьому використовують кукурудзяно–лактозне середовище (КЛС), тіогліколеве середовище [5].

Вимоги до безпеки пробіотичних препаратів і продуктів диктує необхідність розробки нових, ефективних, недорогих виробничих поживних середовищ для кількісного підрахунку біфідобактерій. Проблеми розширення асортименту пробіотичних продуктів пов'язані з великою конкуренцією в умовах інтенсивного розвитку сегменту функціональних продуктів харчування. Це питання можливо вирішити завдяки урахування появи нових потреб і необхідності їх задоволення, при цьому важливе зниження собівартості та збільшення доступності продукції.

За результатами попередніх результатів дослідження, було запропоновано замінити кукурудзяний екстракт соєвою сироваткою, через те, що вона багата біфідогенними факторами, окрім того є джерелом харчових волокон та ізофлавінів, тому сама по собі є стимулятором росту біфідобактерій [6].

Завдяки заміні початкової сировини кукурудзяно–лактозного середовища (КСЛ) – кукурудзяного екстракту на соєву сироватку – зменшувались витрати на приготування поживного середовища, та збільшувалась біомаса культивованих мікроорганізмів, що значно впливало на собівартість продукту та мало екомічний ефект. Попередні показники даних по накопиченню біомаси біфідобактерій на середовищі із додавання соєвої сироватки, що опубліковані у попередній статті, були вищими, ніж на середовищі КСЛ, тому з ціллю збільшення економічного ефекту продукту, запропоновано дослідити можливість використання соєво–лактозного середовища не тільки для накопичення врожаю біфідобактерій, а й для їх кількісного підрахунку у препаратах та продуктах харчування.

Метою роботи було удосконалення складу поживного середовища для кількісного підрахунку життєздатних клітин біфідобактерій у продуктах харчування та біологічно–активних препаратах пробіотичного призначення.

Об'єкти дослідження. У роботі використовували музейні культури *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, які є найбільш поширеними пробіотичними мікроорганізмами, що використовують в промисловому масштабі. З метою оцінки кількості біфідобактерій у препаратах та продуктах харчування використовували класичне напіврідке поживне середовище (кукурудзяно–лактозне середовище) та напіврідке лактозне середовище з додаванням різної масової частки соєвої сироватки.

Матеріалі та методи.

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

Готували добові культури другого пасажу *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, які культивували на рідкому соєво–лактозному середовищі з додаванням 3% соєвої сироватки. Термостатування проводили при температурі (37 ± 1) °С протягом 24 годин відбувалося накопичення клітин у титрі не менше ніж $1 \cdot 10^9$ КУО/см³.

Приготоване напіврідке поживне середовище з додаванням соєвої сироватки від 1 – 6% із значенням активної кислотності рН=6,8–7,0 ед. рН стерильно розливали по 9 см³ в два ряди пробірок.

З першого розведення культур *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adlescentis*. готували послідовні десятикратні розведення до 10–го розведення з таким розрахунком, щоб останній з них не містив біфідобактерій. Із зроблених розведень культур, що досліджувались, здійснювали висів 1см³ в два паралельні ряди пробірок із свіжоприготованим напіврідким поживним середовищем з додаванням соєвої сироватки від 1 – 6 %. Культивування біфідобактерій проводили протягом 72 год при температурі (37 ± 1) °С. Кукурудзяно–лактозне середовище (КЛС) використовували у якості контролю.

Облік результатів здійснювали за наявністю в останньому розведенні характерних колоній у вигляді комет. За кінцевий результат аналізу приймали середнє арифметичне значення, яке отримали у двох паралельних рядах (таб. 1).

Додатково проводили мікроскопію ізольованих колоній з встановленням морфологічних ознак.

На другому етапі досліджень соєво–лактозного середовища проводили визначення концентрації біфідобактерій в пробіотичному препараті використовували «Біфідумбактерин» у формі ліофілізату з різним строком придатності. Дослідження проводили у вересні місяці поточного року. Отримано результати кількості життєздатних клітин біфідобактерій, які виражали у колонієутворюючих одиницях в 1см³ (КУО/см³) та титрованої кислотності – у градусах Тернера (°Т) на соєво–лактозному й кукурудзяно–лактозному поживних середовищах (таб. 2).

Активність кислотоутворення культур біфідобактерій визначали титрометричним методом в контрольному і експериментальних середовищах. Титровану кислотність вчислили по формулі:

$$^{\circ}\text{T} = \text{A} \cdot \text{K} \cdot 10, \text{ де}$$

A — кількість мілілітрів 0,1 М, яку використовували для титрування 10 см³ культуральної рідини;

K — поправка до титру 0,1 М розчину натрія гідроксида;

$^{\circ}\text{T}$ — умовна величина, яка виражена в градусах Тернера.

Результати.

Після 72 годин культивування у напіврідкому поживному середовищі з додаванням 3 % соєвої сироватки дослідні культури біфідобактерій утворювали наступну кількість колонієутворюючих одиниць: *B. bifidum* – 5·10⁹ КУО/см³, *B. adolescentis* – 6·10⁹ КУО/см³, *B. longum* – 1·10¹⁰ КУО/см³, що максимально наближувалися до значень у контрольному зразку: *B. bifidum* – 4·10⁹ КУОЕ/см³, *B. adolescentis* – 5·10⁹ КУО/см³, *B. longum* – 9·10⁹ КУО/см³. З підвищенням масової частки соєвої сироватки від 4% до 5 % кількість життєздатних клітин збільшувалася відповідно: *B. bifidum* – 6·10⁹ КУО/см³ і 7·10⁹ КУО/см³, *B. adolescentis* – 7·10⁹ КУО/см³ і 8·10⁹ КУО/см³, *B. longum* – 3·10¹⁰ КУО/см³ і 4·10¹¹ КУО/см³. Колонієутворюючі одиниці мали вигляд комет або зерен з утворенням верхньої стерильної зони, що характерно для бактерій роду *Bifidobacterium* (табл. 1).

В останньому зразку експериментального середовища (6 % соєвої сироватки) вже за першу добу культивування показники кількості колонієутворюючих одиниць усіх штамів роду *Bifidobacterium* перевищували показники інших зразків запропонованих середовищ: *B. bifidum* – 5·10¹⁰ КУО/см³, *B. adolescentis* – 9·10⁹ КУО/см³, *B. longum* – 5·10¹⁰ КУО/см³.

Таблиця 1

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

Назва штаму	Масова частка соєвої сироватки, %	Час культивування, год		
		24год	48год	72год
<i>B. bifidum</i>		Показники росту мікроорганізмів, КУО/см ³		
	1%	3·10 ⁵	5·10 ⁶	7·10 ⁷
	2%	5·10 ⁵	8·10 ⁷	2·10 ⁸
	3%	6·10 ⁶	8·10 ⁸	5·10 ⁹
	4%	4·10 ⁷	9·10 ⁹	6·10 ⁹
	5%	1·10 ⁸	8·10 ⁹	7·10 ⁹
	6%	6·10 ⁹	1·10 ¹⁰	2·10 ¹⁰
Контроль (КСЛ)	2·10 ⁶	6·10 ⁸	4·10 ⁹	
<i>B. adolescentis</i>		Показники росту мікроорганізмів, КУО/см ³		
	1%	4·10 ⁵	6·10 ⁶	8·10 ⁷
	2%	7·10 ⁵	6·10 ⁷	4·10 ⁸
	3%	6·10 ⁶	8·10 ⁸	6·10 ⁹
	4%	1·10 ⁷	3·10 ⁹	7·10 ⁹
	5%	3·10 ⁸	7·10 ⁹	8·10 ⁹
	6%	5·10 ⁸	8·10 ⁹	9·10 ⁹
Контроль (КСЛ)	4·10 ⁶	4·10 ⁸	5·10 ⁹	
<i>B. longum</i>		Показники росту мікроорганізмів, КУО/см ³		
	1%	5·10 ⁵	7·10 ⁶	6·10 ⁷
	2%	9·10 ⁵	8·10 ⁷	6·10 ⁸
	3%	8·10 ⁶	7·10 ⁸	1·10 ¹⁰
	4%	6·10 ⁸	8·10 ⁹	3·10 ¹⁰
	5%	8·10 ⁹	2·10 ¹⁰	4·10 ¹⁰
	6%	6·10 ⁹	3·10 ¹⁰	5·10 ¹⁰
Контроль (КСЛ)	6·10 ⁶	6·10 ⁸	9·10 ⁹	

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

Колонії мали вигляд довгих тяжів або комет. При анаеробних умовах (заливали маслом поверхню напіврідкого середовища) ріст був рівномірним по всьому об'єму пробірки, у випадку відсутності маслянистої плівки, яка утворювала б анаеробні умови, колонії біфідобактерій знаходились ближче до дна пробірки.

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

При визначенні концентрації біфідобактерій в пробіотичному препараті «Біфідумбактерин» у формі ліофілізату з різним строком придатності було виявлено, що всі експериментальні зразки напіврідкого поживного соєво–лактозного середовища незначною мірою відрізнялися від контролю, проте мали більш високі показники колонієутворюючих одиниць та титрованої кислотності (таб. 2).

Таблиця 2

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

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

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

Висновки. В результаті узагальнення даних експерименту була встановлена можливість використовувати 3–5 % соєвої сироватки у лактозному середовищі для контролю кількості життєздатних біфідобактерій у продуктах харчування та біологічно–активних препаратів, що використовуються в медицині для корекції та профілактики дисбактеріозів.

Результати мікробіологічних дослідження показали, що при культивуванні біфідобактерій на запропонованому напіврідкому лактозному середовищі з додаванням соєвої сироватки морфологічні та культуральні властивості біфідобактерій всіх культур

відповідали видам *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*.

Можна рекомендувати напіввідке поживне середовище з додаванням 3% соєвої сироватки для контролю кількості клітин біфідобактері у функціональних продуктах харчування, а з 4-5 % соєвої сироватки для контролю біологічно-активних препаратів про біотичного призначення.

Література

1. Бондаренко В. М., Воробьев А. А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией. // Журн. микробиол. – 2004. – № 1. – С. 84-92.
2. Бондаренко В. М., Грачева Н. М., Матсулевич Т. В. Дисбактериозы кишечника у взрослых. // КМК Scientific Press. – Москва, 2003. – С. 224.
3. Патент РФ №99107061/13, Способ количественной оценки содержания бифидобактерий в смешанных культурах микроорганизмов / Шендеров Б. А.; Степанчук Ю. Б. Изобретения. – 2000.
4. Пребиотики: химия, технология, применение. / Л. В. Капрельянц. – Киев: ЭнтерПринт, 2015. – 252с.
5. Методические указания МУК 4.2.577–96. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов: Методические указания. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. – 95 с.
6. Капрельянц Л. В., Труфкати Л. В., Крупицька Л. О. Поживне середовище для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на основі рослинної сировини. // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. Т.3. – №4 (64). – 2015. – С. 47– 54.

References

- Bondarenko, V. M., Vorobev, A. A. (2004). Disbiozy i preparaty s probioticheskoy funktsiey. // Zhurn. mikrobiol. 1, 84–92. (in Russian).
- Bondarenko, V. M., Gracheva, N. M., Matsulevich, T. V. (2003). Disbakteriozyi kischechnika u vzroslyih. // KMK Scientific Press. – Moskva, 224. (in Russian).
- Patent RF #99107061/13, Sposob kolichestvennoy otsenki soderzhaniya bifidobakteriy v smeshannyih kulturah mikroorganizmov/ Shenderov B. A.; Stepanchuk Yu. B., Izobreteniya. – 2000. (in Russian).
- Kaprelyants, L. V. (2015). Prebiotiki: himiya, tehnologiya, primenenie. Kiev: EnterPrint, 252. (in Russian).
- Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.577–96. Metody mikrobiologicheskogo kontrolya produktov detskogo, lechebnogo pitaniya i ih komponentov: Metodichskie ukazaniya. – M.: Informatsionno-izdatelskiy tsentr Minzdrava Rossii, 1998. – 95 s. (in Russian).
- Kaprel'yants, L. V., Trufkati, L. V., Krupyt'ska, L. O. (2015). Pozhyvne seredovyshe dlya kul'tyvuvannya bakteriy rodu Bifidobacterium na osnovi roslynnoyi syrovyny. // Naukovyy visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Hzyts'koho. T.3. – 4 (64), 47– 54. (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 1.04.2016

УДК 66.061.34

Коляновська Л. М., к. т. н. (kolyanovska@mail.ru) ©

Вінницький національний аграрний університет, м. Вінниця, Україна

ПІДВИЩЕННЯ ЯКОСТІ РОСЛИННИХ ОЛІЙ ПРИ ЕКСТРАГУВАННІ ЕТИЛОВИМ СПИРТОМ З ІНТЕНСИФІКАЦІЄЮ НАДВИСОКОЧАСТОТНОЮ ЕНЕРГІЄЮ

В рослинних оліях є необхідні для життєдіяльності людини кислоти лінолева сімейства $\omega-6$ та ліноленова сімейства $\omega-3$, які не синтезуються в організмі людини. Важливим фактором харчової цінності рослинних олій є кількість та співвідношення цих кислот. Як свідчать дослідження в галузі медицини на Україні співвідношення та кількість даних елементів в 3 рази менше необхідної норми для повноцінного харчування. Перш за все, це пов'язано із обмеженістю асортименту олій в повсякденному раціоні та обмеженістю купажованих олій. Соняшникова олія, що