

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – КМР. 1764 “С” 2020.11.12. 11 ПЗ

**ХРАПАЧЕВСЬКОГО ВЛАДИСЛАВА
ЄВГЕНОВИЧА**

2021 р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

НУБІП України

Факультет (ННІ) захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 604.7:582.929.4

НУБІП України

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету (Директор ННІ)
захисту рослин, біотехнологій та екології
(назва факультету (ННІ))

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
Екобіотехнології та біорізноманіття
(назва кафедри)

Коломієць Ю. В. (підпис) 20__ р. Кваско О. Ю. (підпис) 20__ р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Створення бактеріального препарату з підвищеною β-галактозидазною властивістю біотехнологічними методами».

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія» (код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» (назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна (освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми (науковий ступінь та вчене звання) (підпис) (ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Доктор с.-г. наук, професор (науковий ступінь та вчене звання) (підпис)

Бородай В. В. (ПІБ)

Виконав (підпис)

Храчачевський В. Є. (ПІБ студента)

НУБІП України

КИЇВ – 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет (ННІ) захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри _____

(науковий ступінь, вчене звання)

(підпис)

(ПІБ)

20

року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Храпачевський Владислав Євгенович

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Створення бактеріального препарату з підвищеною β -галактозидазною властивістю біотехнологічними методами».

затверджена наказом ректора НУБіП України від «12» листопада 2020 р. № 1764 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 22 листопада 2021р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи Процес культивування молочно-кислих бактерій (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) *in vitro*, перевірка бета-галактозидазної активності представлених штамів молочно-кислих бактерій, вплив комбінування різних штамів та родів молочно-кислих мікроорганізмів на підвищення утилізації лактози.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Перевірка життєздатності та мікробіологічної чистоти відновлених культур молочно-кислих бактерій.
2. Оцінка бета-галактозидазної активності різних родів молочно-кислих бактерій.
3. Підбір комбінації різних видів молочно-кислих бактерій для отримання найбільшого показника бета-галактозидазної активності.

Перелік графічного матеріалу (за потреби) _____

Дата видачі завдання «1» жовтня 2020 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____

(підпис)

Бородай В. В.

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____

(підпис)

Храпачевський В. Є.

(прізвище та ініціали студента)

Реферат

Тема магістерської роботи – «Створення бактеріального препарату з підвищеною β -галактозидазною властивістю біотехнологічними методами».

Дана робота вміщує 3 розділи, 18 підрозділів та 63 наукової літератури та інтернет-джерел. Також робота містить 21 ілюстрацію та 1 таблицю.

Предметом дослідження даної наукової роботи були штамм молочнокислих бактерій *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Streptococcus*.

Об'єктом дослідження було створення бактеріального препарату на основі штамів молочнокислих бактерій з підвищеною бета-галактозидазною активністю. Метою наукової роботи було проаналізувати β -галактозидазну активність кисломолочних бактерій як один із факторів процесу відбору цих бактерій для створення бактеріальних препаратів, які б містили даний фермент.

У першому розділі викладено інформацію про саму бета-галактозидазу, її характеристики, функції та головна роль в житті та здоров'ї людини. Викладено основний матеріал щодо дослідження бета-галактозидазної активності, та аналіз цієї активності в деяких бактеріальних препаратах на основі штамів молочнокислих бактерій *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Streptococcus*.

В другому розділі було визначено головні об'єкти та методи дослідження, викладено матеріал щодо процесу перевірки бета-галактозидазної активності в заквасках та інших молочних продуктах, які сьогодні споживає людина.

В третьому розділі викладено основні результати дослідження щодо біотехнологічних аспектів відбору штамів мікроорганізмів для одержання молочних заквасок на основі даних штамів мікроорганізмів, а також викладено сам процес перевірки активності ферменту бета-галактозидази в молочних заквасках.

ЗМІСТ	
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1 Розкриття сутності проблеми сприйняття лактози людським організмом	10
1.2 Фермент β-галактозидаза – характеристика ферменту, його функції у людському організмі та механізм його дії	14
1.3 Дослідження принципу використання ферменту для відбору штамів для створення бактеріальних препаратів	19
1.4. Бактеріальні препарати на основі β-галактозидаза, створені біотехнологічними методами	24
1.4.1 Лацидофіл	24
1.4.2 Симбітер ацидофільний	26
1.4.3 Біфіформ	28
1.5 Біотехнологічні аспекти застосування штамів мікроорганізмів з бета- галактозидазною активністю	29
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	40
2.1 Умови проведення науково-дослідницької роботи та об'єкт досліджень	40
2.2 Обґрунтування способу культивування	45
2.3 Приготування, стерилізація поживних середовищ та умови культивування	46
2.4 Перевірка наявності бета-галактозидазної активності молочнокислої закваски	39
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52

3.1 Відновлення музейної культури та перевірка мікробіологічної чистоти культур.....	52
3.2. Визначення бета-галактозидазної активності досліджуваних штамів та їх композицій.....	50
3.3 Одержання нової бактеріальної закваски.....	53
ВИСНОВКИ.....	60
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	65

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Перспективною соціально важливою галуззю застосування біотехнологій є розробка бактеріальних препаратів для кисломолочних

напоїв функціонального призначення з низьким вмістом лактози та високим вмістом біоактивних речовин. Загальновідомо, що деякі люди страждають від

непереносимості лактози, що пов'язано з генетично обумовленим дефіцитом β -галактозидази. Цей фермент розщеплює лактозу на біологічні процеси,

харчові біотехнології, моносахариди-глюкозу та галактозу, тому є ключем до дріжджових мікроорганізмів у процесі ферментації для розщеплення

молочної лактози.

Доцільно вивчити активність β -галактозидази окремого штаму та його склад як основний компонент ферментаційної культури. Отримані дані

можуть бути використані для відбору мікроорганізмів для створення бактеріальної комбінації дріжджів. Результати досліджень дозволять

отримати доступ до молочних продуктів з низьким вмістом лактози.

Як ми всі знаємо, кисломолочні продукти містять менше лактози і багаті ферментами, вітамінами, антибактеріальними речовинами, пептидами,

вільними амінокислотами, органічними кислотами, які можуть покращити їх біологічну активність та визначити специфічні пробіотики та необхідні

технічні характеристики. Тому створення стартера на основі мікроорганізмів з високою біохімічною активністю є однією з вимог до штамів, що беруть

участь у його складі.

Розробляючи сучасну готову технологію, вона повинна відповідати вимогам технологічності, складності, екологічності, біологічної безпеки та

енергоефективності. Використання спеціальних мікроорганізмів із сильною здатністю синтезувати β -галактозидазу у дріжджових інгредієнтах має

актуальність і практичне значення для виробництва молочних продуктів з низьким вмістом лактози. Одним з найважливіших завдань молочної

промисловості є створення нових молочних продуктів, які можуть

задовольнити потреби різних людей, включаючи різні захворювання та патології.

Мета роботи – проаналізувати β -галактозидазну активність

кисломолочних бактерій як один із факторів процесу відбору цих бактерій для створення бактеріальних препаратів, які б містили даний фермент.

Завдання, які постають для виконання наукової роботи:

1. Аналіз наукової літератури та інтернет-джерел щодо проблематики наукової роботи

2. Створення бактеріальних препаратів на основі бета-галактозидази

Предмет дослідження – штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus Bifidobacterium* та *Streptococcus*.

Об'єкт дослідження – створення бактеріального препарату на основі штамів молочнокислих бактерій з підвищеною бета-галактозидазною активністю.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Розкриття сутності проблеми сприйняття лактози людським організмом.

Лактоза - це молочний цукор, особливий вуглевод, який міститься в молоці та грудному молоці. Лактоза є дисахаридом, тобто складається з двох моносахаридів - глюкози і галактози.

Як ми всі знаємо, навіть після кількох ковтків молока деякі люди відчувають різні симптоми, від легкого здуття живота до тимчасових психічних розладів [1]. Ця реакція виникає через непереносимість лактози

або алергії на молочний білок. У дітей ці дві реакції можуть співіснувати. Молоко є першим джерелом чужорідного білка і важливим джерелом харчування для дітей, тому його не можна виключати з раціону дитини.

Гіппократ вперше описав лактазну недостатність приблизно в 400 році до нашої ери, але лише за останні 50 років клінічні симптоми були виявлені в практичній медицині [2].

Якщо немає зрілих, функціонально активних кишкових клітин, неможлива висока лактазна активність. Якщо вироблення лактази низька, лактоза не буде розщеплена до кінця, проходячи через кишечник в неперетравленому вигляді і викликаючи дискомфорт [1]. Цей стан називається **дефіцитом лактази або непереносимістю лактози (ЛН)**.

Дефіцит лактази (ЛД) викликається лактазою (β -галактозидазою), яка порушує розпад лактози в тонкому кишечнику. Така ситуація дуже поширена і зустрічається практично в будь-якому віці. Поширеність ЛН різна в різних частинах світу: Швеція, Данія -3%, Фінляндія, Швейцарія-16%, Великобританія-20-30%, Франція-42%, країни Південно-Східної Азії, афроамериканці-80-100%, європейська частина Росії -16-18%. Проблема ЛН особливо актуальна в ранньому дитинстві, оскільки на лактозу припадає близько 80-85% вуглеводів у грудному молоці [3].

Є дві основні причини, чому клітини кишечника знижують вироблення лактази.

Перша причина — генетичний дефект або фізіологічна незрілість ферментної системи (через незрілі клітини кишечника незріла здатність до синтезу лактази, що часто зустрічається у недоношених дітей). Це первинна лактазна недостатність, при якій кишкові клітини в тонкій кишці залишаються неушкодженими [1].

Друга причина - запалення або інші процеси в організмі (харчова алергія, пухлини, операції на тонкому кишечнику). Це вторинна лактазна недостатність, при якій пошкоджуються клітини кишечника. Він може бути тимчасовим або постійним.

Максимальна активність лактази у новонароджених гестаційного віку становить 39-40 тижнів, і вона зберігається в першому півріччі життя. Зниження експресії лактази зазвичай закінчується в дитинстві, але це зниження може спостерігатися і в пізньому підлітковому віці. [4] Швидкість втрати активності лактази варіюється від раси до раси, але фізіологічне пояснення цієї різниці неясно. Приблизно 30% населення мають високу активність лактази в зрілому віці. [5] В основному це трапляється у людей північного походження і пов'язано із запровадженням молочного виробництва близько 10 000 років тому.

Під впливом тиску відбору стійкість лактази збільшувалася на 1,5-19% за покоління. Точний молекулярний механізм персистенції лактази неясний. [6] Так звана «гіпотеза культурної історії» пояснює, що внаслідок еволюційного відбору, коли люди починають покладатися на молоко ссавців як важливу частину харчування, особливо у випадку поганого врожаю, поширеність лактози в північній Європі дуже високий. [7]

Згідно з «гіпотезою негараздів», люди з високою лактазною активністю можуть погодитися на розведення дійних корів і споживання молока. Але дані аналізу ДНК, отримані археологами, показують, що ця гіпотеза малоймовірна. [8] У Південній Америці, Африці та Азії більше 50% населення страждає на непереносимість лактози, тоді як у деяких азіатських країнах цей показник становить майже 100% [7] (рис. 1.1).

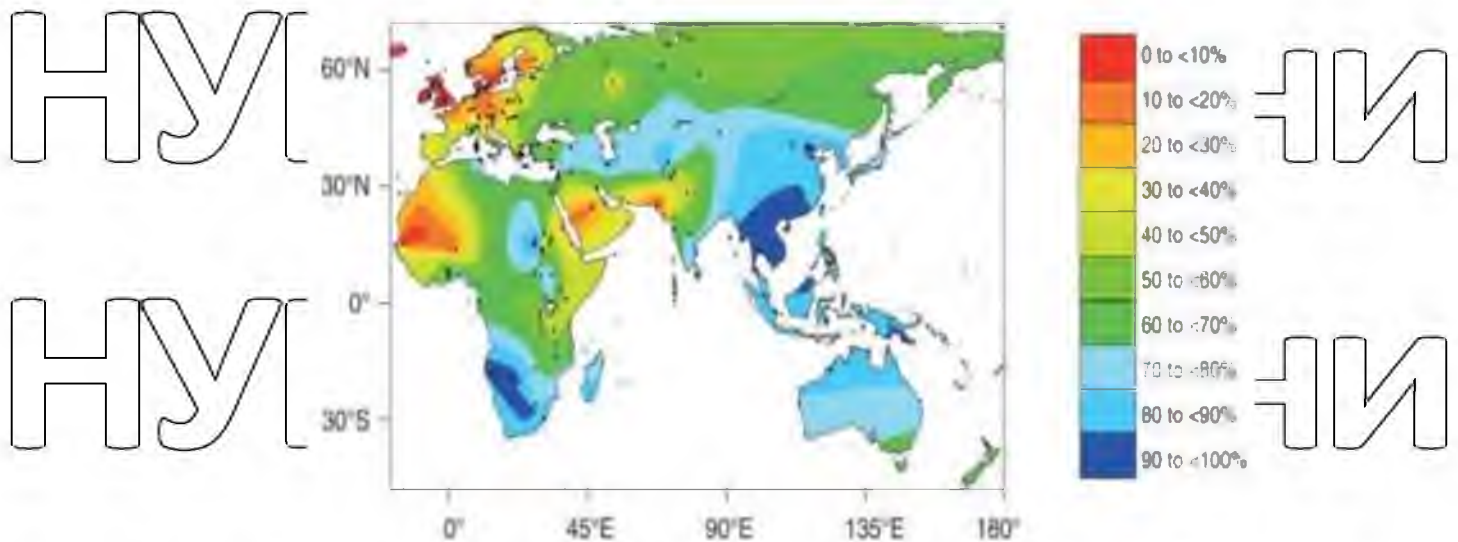


Рис. 1.1 Розповсюдженість лактозної недостатності в східній півкулі

(United European Gastroenterol J. 2013 Jun; 1(3): 151-159) [7]

Середній вік початку та поширеність у різних популяцій різні.

Приблизно 20% іспанських, азіатських та афроамериканських дітей у віці до

5 років мають ознаки лактозної недостатності, а білі діти зазвичай не мають

симптомів непереносимості лактози до 4-5 років [9]. На жаль, наразі немає

даних про поширеність непереносимості лактози в Україні.

Отже, термін «лактазна недостатність» відображає зниження

активності лактази, вираженої на верхній поверхні межі епітеліальних клітин

кишечника, внаслідок руйнування епітеліальних клітин кишечника або

зниження/дефіциту секреції ферменту в збережених епітеліальних клітинах

кишечника. Порушення всмоктування лактози викликається

непереносимістю лактози. Коли більша частина лактози не всмоктується в

тонкому кишечнику і транспортується в товстий кишечник, це може

викликати симптоми непереносимості лактози (діарея, дискомфорт у живсті,

метеоризм або здуття живота) [10].

Хоча поняття «системна непереносимість лактози» все ще викликає

суперечки, багато системних проблем можуть бути пов'язані з порушенням

всмоктування лактози, включаючи захворювання шкіри, ревматизм та

хронічну втому. Важливо розуміти, що порушення всмоктування лактози не є

еквівалентом або синонімом непереносимості лактози, оскільки в багатьох

випадках воно не викликає клінічних симптомів. Розвиток симптомів залежить від кількох індивідуальних факторів, включаючи дієту, час метастазування в ротовій порожнині, розподіл кишкової флори та ферментативної здатності, а також психологічні фактори. [11, 12]

Таким чином, поширеність непереносимості лактози може значно перевищувати поширеність симптомів непереносимості лактози серед населення.

Вроджена (гендетермінована) лактазна недостатність є рідкісною та серйозною патологією. Вона спричинена мутаціями в гені LCT (MIM 603202), що призводить до надзвичайно низького рівня лактази-флоризин-гідролази в кишечнику або його відсутності. [13] Вроджена лактазна недостатність була вперше описана у Фінляндії в 1959 році, і її поширеність оцінюється в 1 на 60 000. На той час ця патологія належала до групи вродженої діареї – групи гетерогенних рідкісних захворювань, пов'язаних із специфічними генетичними дефектами. [14]

У новонароджених відразу після вживання грудного молока або суміші, що містить лактозу, спостерігається сильна діарея. Гістологічні характеристики біопсії тонкої кишки були нормальними, але концентрація лактази була низькою або повністю відсутня. Через зневоднення та втрати електролітів цей стан може загрожувати життю дитини.

Тимчасова лактазна недостатність. Дефіцит лактази та інших дисахаридів існує в незрілому шлунково-кишковому тракті. До 28-34 тижнів вагітності активність цього ферменту становить 30% від нормального значення для доношених немовлят. Майже у всіх новонароджених буде знижений рівень лактази (замало гормону лактази), але протягом перших 2-3 місяців життя рівень ферментів у більшості дітей нормалізується. [7] Майже у половини дітей з коліками не вистачає лактази. [15]

Однак наявність лактози у дітей раннього віку дуже важлива, оскільки бактеріальний метаболізм лактози знижує значення рН в товстій кишці (5,0-5,5 є нормою), тим самим сприяючи розвитку біфідобактерій і лактобактерій,

а також пригнічуючи патогени (*Proteus, Escherichia Bacteria*) зростання *Escherichia coli* та *Klebsiella*). Крім того, кислоти (молочна кислота, жири, кислоти), що утворюються при розпаді лактози, беруть участь в енергетичному обміні, диференціації та регенерації клітин, а також стимулюють рух кишечника.

Вторинна лактазна недостатність обумовлена патофізіологічними станами слизової оболонки кишечника. Причини можуть включати: Гостру інфекцію (наприклад, ротавірус), яка може спричинити пошкодження тонкої кишки та руйнування зрілих кишкових клітин. [16, 17] Незрілі епітеліальні клітини, які їх замінюють, зазвичай не мають лактази, що призводить до вторинної лактозної недостатності та порушення всмоктування лактози.

Кілька останніх досліджень показали, що діти з ротавірусними (та іншими інфекційними) діарейними захворюваннями, але не зневодненими або помірно зневодненими, можуть безпечно продовжувати пити грудне молоко або суміші, що містять лактозу, без істотного впливу на вологу та харчування, тривалість або швидкість захворювання. [18]

Однак у дітей з високим ризиком (наприклад, діти до 3 місяців, діти з недостатнім харчуванням) і пацієнтів з інфекційною діареєю непереносимість лактози може бути важливим фактором, що впливає на перебіг захворювання. Лямбліоз, криптоспоридіоз та інші паразитарні захворювання, що вражають проксимальний відділ тонкої кишки, часто викликають порушення всмоктування лактози внаслідок прямого ураження епітеліальних клітин паразитами. [19]

Клінічні симптоми вторинної лактозної недостатності та непереносимості лактози спостерігаються при целиакії, хворобі Крона, імунних захворюваннях та інших ентеропатіях, після тривалого парентерального харчування, алергічних захворюваннях із шлунково-кишковими проявами та бактеріальному надлишку у дітей раннього віку. Синдром росту та прийом ліків. [11, 18] У дітей з тяжким порушенням

харчування тонка кишка скорочується, що також може призвести до вторинної лактозної недостатності.

1.2 Фермент β -галактозидаза – характеристика ферменту, його функції у людському організмі та механізм його дії.

Загальна характеристика ферменту

Бета-галактозидаза, або β -галактозидаза, фермент, гліковид гідролаза, каталізує гідроліз β -галактозидази на моносахариди шляхом розщеплення глікозидних зв'язків. Бета-галактозидази (субстрати цього ферменту) — це вуглеводи, що містять галактозу як один із фрагментів (рис. 1.2).

Субстратами різних ферментів β -галактозидази є гангліози, GM1, лактозацерамід, лактоза та різні глікопротеїди [20].

Структура. 1023 амінокислот з *E. coli* β -галактозидазу була точно секвенована в 1983 році, і її структура була визначена через двадцять чотири роки, в 1994 році, білок є 464-кДа гомететрамер з 2,2,2-точковою симетрією. Кожна одиниця β -галактозидази складається з п'яти доменів, домен 1 являє собою β -циліндр типу желе, домен 2 і 4 являють собою фібронектин типу III-подібні бочки, домен 5 являє собою новий β -сандвіч, а центральний домен 3 являє собою спотворений стовбур типу TIM, позбавлений п'ятої спіралі з спотворенням шостого ланцюга [20, 21].

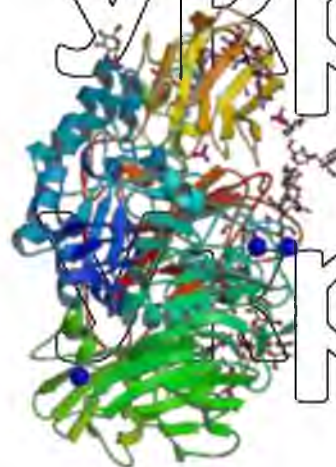


Рис. 1.2 Структура ферменту

Третій домен містить активні сайти. Активний центр складається з елементів двох субодиниць тетрамеру. Дисоціація тетрамеру на димер може

видалити ключові елементи активного центру [22]. Амінокінцева послідовність β -галактозидази (α -пептид, який бере участь у α -комплементарності) бере участь у інтерфейсі субодиниці. Його залишки 22-31

допомагають стабілізувати чотири пучки спіралей, які складають основну частину інтерфейсу, а залишки 13 і 15 також допомагають утворити активний інтерфейс. Ці особливості будови пояснюють феномен α -компліментарності, тобто делеція амінокінцевого фрагмента призводить до утворення неактивних димерів [20].

Застосування. Аналіз бета-галактозидази зазвичай використовується в генетиці, молекулярній біології та інших науках про життя. Для виявлення активного ферменту можна використовувати штучний хромогенний субстрат 5-бром-4-хлор-3-індол- β -D-галактопіранозид, X-gal [23, 24]. β -галактозидаза розщеплює глікозидний зв'язок в X-gal з утворенням галактози та 5-бром-4-хлор-3-гідроксіндолу, останній димеризується та окислюється до 5,5'-дибром-4,4'-дихлор-індиго, продукт темно-синього кольору, який легко ідентифікувати та визначити кількісно. Наприклад, він використовується для синьо-білих екранів. Його виробництво може бути індуковано негідролізованим аналогом ізолактози IPTG, який зв'язує та вивільняє *lac*-репресор від *lac*-оператора, тим самим дозволяючи ініціації транскрипції продовжувати [23, 25].

Він зазвичай використовується в молекулярній біології як репортерний маркер для контролю експресії генів. Він також продемонстрував явище, яке називається α -комплементарністю, що є основою для відбору синьо-білих рекомбінантних клонів. Цей фермент можна розділити на два пептиди, *LacZ* α і *LacZ* Ω , обидва з яких неактивні, але коли вони існують разом, вони спонтанно знову збираються у функціональний фермент [26]. Ця особливість використовується в багатьох векторах для клонування, в яких присутність гена *lacZ* α в плазміді може доповнювати інші трансмутовані гени, що кодують *LacZ* Ω , у конкретних лабораторних штаммах *E. coli*. Однак, коли фрагмент ДНК вставляється у вектор, продукція *LacZ* α порушується, тому

клітина не проявляє активності β -галактозидази. X-gal може виявити наявність або відсутність активної β -галактозидази, коли вона розщеплюється β -галактозидазою, він виробляє характерний синій барвник, забезпечуючи таким чином простий спосіб розрізнити плазмідні, чи є в них клоновані продукти. У дослідженні хромосомної транслокації при лейкемії Добсон та його колеги використовували злитий білок LacZ у мишей, використовуючи тенденцію β -галактозидази до олігомеризації, що вказує на потенційну роль олігомеризації у функції злитого білка MLL [26].

Нова ізоформа β -галактозидази з оптимальною активністю при pH 6,0 (пов'язана зі старінням β -gal або SA- β -gal), яка є специфічною щодо старіння (необоротна зупинка клітин). Розроблено навіть спеціальний кількісний аналіз для виявлення. Проте зараз відомо, що це пов'язано з надмірною експресією та накопиченням лізосомної ендогенної β -галактозидази, і її експресія не є необхідною для старіння [27]. Однак він все ще є найбільш широко використовуваним біомаркером для старіння і старіння клітин, оскільки він надійний і його легко виявити.

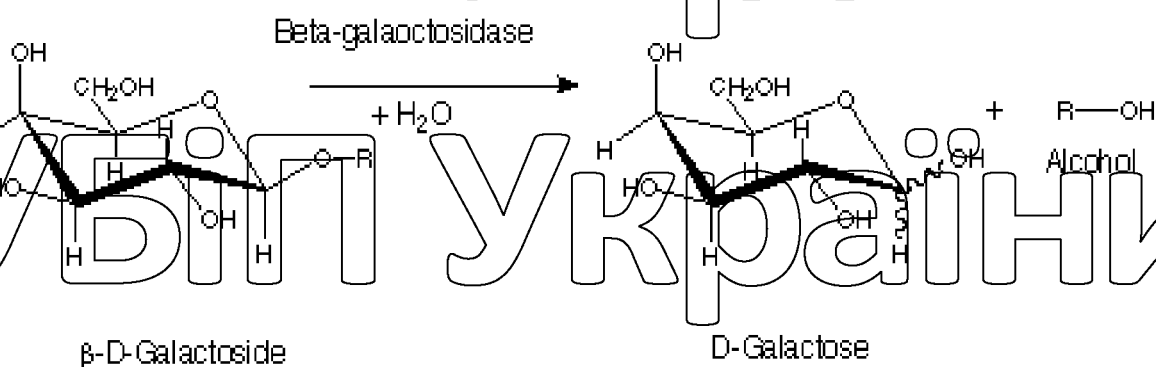


Рис. 1.3 Реакція виділення D-галактози з бета-галактозидази

Активність β -галактозидази є одним із критеріїв відбору штамів до складу бактеріальних препаратів для кисломолочних продуктів спеціального призначення. Цей фермент є ключем до того, щоб дріжджові мікроорганізми розкладали лактозу в молоці [20]. Одним із важливих критеріїв складу ферментованих композицій у виробництві кисломолочних продуктів є їх склад.

Встановлено, що розвиток штамів *Streptococcus thermophilus* у молоці відзначався найбільшим зниженням вмісту лактози, що свідчить про те, що вони мають високу здатність продукувати β -галактозидазу порівняно з *Bifidobacterium* та *Propionibacterium frederi*. [20] Мікробний симбіоз, що складається з *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* та пропіоновокислих бактерій, показав найбільшу активність β -галактозидази, яка становить -604 А/хв.

Як ми всі знаємо, якість і біологічна цінність кисломолочних продуктів безпосередньо залежать від використовуваного ферментованого препарату.

Тому для отримання кисломолочних продуктів спеціального призначення з низькою концентрацією лактози досліджували високоактивні штами мікробів. Коефіцієнт використання лактози в готовому продукті досліджуваних штамів та їх комбінацій становив від 12,1% до 35,8% їх початкової концентрації [20]. Показано, що активність β -галактозидази та використання лактози в готовому продукті є штам-специфічними характеристиками.

Функції та принцип роботи ферменту

β -галактозидаза — екзоглікозидаза, здатна гідролізувати β -глікозидний зв'язок, що утворюється між галактозою та її органічною частиною. Він також може розкласти фукозид і арабінозид, але ефективність значно нижча. Це важливий фермент в організмі людини. Дефіцит білка може призвести до галактозезіального ацидозу або синдрому Морхіо В [28]. У *E. coli* ген *lacZ* є структурним геном β -галактозидази, він є частиною індукційної системи *lac* оперонів, яка активується в присутності лактози, коли рівень глюкози низький. Коли рівень глюкози достатній, синтез β -галактозидази припиняється.

β -галактозидаза має багато гомологів на основі подібних послідовностей. Деякі з них — це виділена β -галактозидаза (EBG), β -глюкозидаза, 6-фосфо- β -галактозидаза, β -манозидаза і гідролаза цвітіння лактази. Хоча вони можуть бути схожими за структурою, всі вони виконують

різні функції. Бета-гал пригнічується L-рибозою, яка є неконкурентним інгібітором йоду та фенілтіо- β -D-галактозидом (PETG), D-галактосактоном, ізопротітно-конкурентним інгібітором β -D-галактозиду (IPTG) та галактози [28].

Бета-галактозидаза важлива для організмів, оскільки вона є ключовим постачальником енергії та виробництва вуглецю, розщеплюючи лактозу на галактозу та глюкозу. Це також важливо для спільноти з непереносимістю лактози, оскільки вона відповідає за виробництво безлактозного молока та інших молочних продуктів. Багатьом дорослим не вистачає лактази, яка виконує ту ж функцію, що і β -гал, тому вони не можуть належним чином перетравлювати молочні продукти. Бета-галактоза використовується в молочних продуктах, таких як йогурт, сметана та деякі сири [29]. Ці продукти обробляють ферментами для розщеплення лактози перед вживанням людиною. В останні роки β -галактозидазу досліджували як потенційний засіб лікування непереносимості лактози шляхом генної замісної терапії. Її можна помістити в ДНК людини, щоб люди могли самостійно розщеплювати лактозу [29, 30].

β -галактозидаза може каталізувати три різні реакції в організмі (рис. 1.3, 1.4). Одне з них полягає в тому, що він може піддаватися процесу, який називається трансгалактозилюванням, який створює петлю позитивного зворотного зв'язку для виробництва β -gal з утворенням алолактози [31].

Ізолактоза також може розщеплюватися з утворенням моносахаридів. Він також може гідролізувати лактозу на галактозу та глюкозу, а потім у гліколіз. Активний центр β -галактозидази каталізує гідроліз її дисахаридного субстрату за допомогою комбінації «мілкового» (невиробнича ділянка) і «глибокого» (дільниця виробництва). Коли фермент знаходиться у «відкритій» конформації, галактозиди (такі як PETG і IPTG) зв'язуються на тонкому місці, а коли конформація «закрита», тимчасові аналоги, такі як L-рибоза та D-галактосактон, зв'язуються з глибокий шар [31].

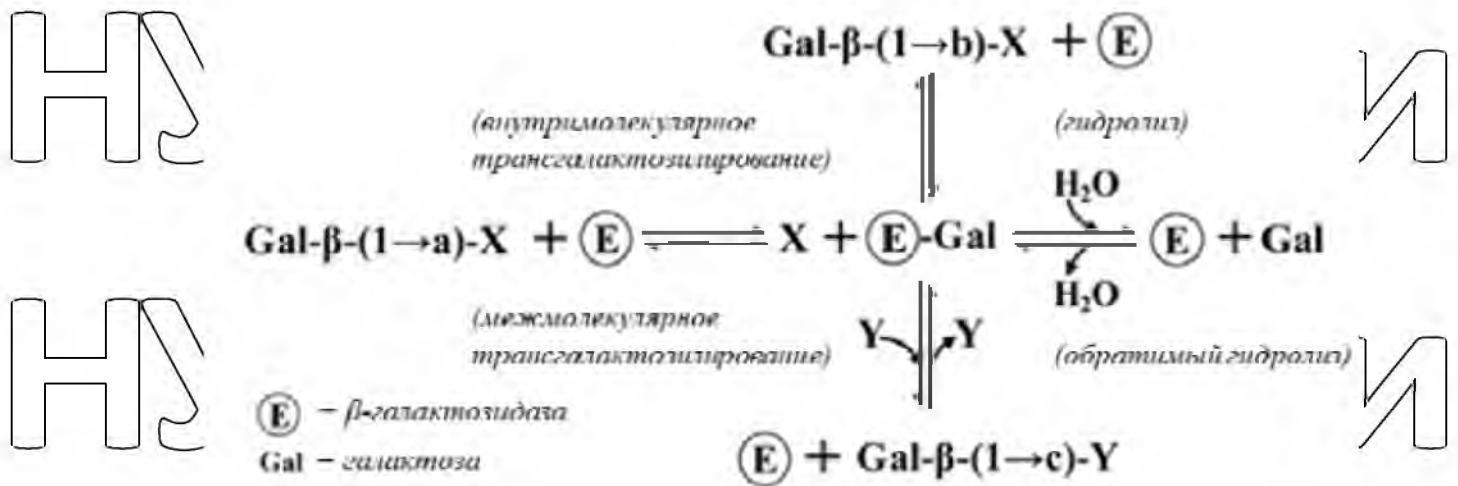


Рис. 1.4 Схема ферментативного гідролізу β-D-галактозидів і синтеза галактоолігосахаридів

Ферментативна реакція включає дві хімічні стадії: галактозилування (k2) і дегалактозилування (k3). Галактозилування є першою хімічною стадією реакції. Коли Glu461 надає протони кисню глікозиду, це змушує галактозу утворювати ковалентний зв'язок з Glu537. На другому етапі, дегалактозилування, коли Glu461 приймає протон, ковалентний зв'язок розривається і галактоза замінюється водою. Під час реакції в глибокій області ферменту з'являться два перехідних стану, які з'являтимуться один раз після кожного кроку [32]. Коли в реакції бере участь вода, утворюється галактоза, інакше, коли D-глюкоза виступає як акцептор другого етапу, відбувається трансгалактозилування. Кінетичні вимірювання показують, що один білковий тетрамер каталізує реакцію зі швидкістю $38\,500 \pm 900$ реакцій на хвилину. Для оптимальної активності ферменту необхідні одновалентні іони калію (K) і двовалентні іони магнію (Mg) [32]. β-зв'язок субстрату розщеплюється кінцевою карбоксильною групою на бічній ланцюзі глутамінової кислоти.

1.3 Дослідження принципу використання ферменту для відбору штамів для створення бактеріальних препаратів

Як ми всі знаємо, деякі люди відчувають різні симптоми навіть після кількох ковтків молока — від легкого здуття живота до тимчасових

психічних розладів [1]. Реакція через непереносимість лактози або алергію на білок молока. У дітей ці дві реакції можуть співіснувати. Молоко є першим джерелом білка для дитини і важливим джерелом харчування, тому його не можна виключати з дитячого раціону [1].

Близько 400 р. до н.е. Гіппократ вперше описав дефіцит лактази, але за останні 50 років його клінічні симптоми були визнані в практичній медицині [1]. Дефіцит лактази (ЛД) викликається лактазою (β-галактозидазою), яка порушує розщеплення лактози в тонкому кишечнику. Цей дефіцит є поширеним і зустрічається майже в будь-якому віці. Поширеність ЛН різна в різних частинах світу: Швеція, Данія-3%, Фінляндія, Швейцарія-16%, Велика Британія-20-30%, Франція-42%, країни Південно-Східної Азії, американські афроамериканці-80-100 %, європейська частина Росії-16-18%. Проблема ЛН особливо актуальна в ранньому дитинстві, оскільки на лактозу припадає близько 80-85% вуглеводів у грудному молоці [1].

Деякі види непереносимості лактози добре відомі. Наприклад, деякі захворювання травної системи і ураження тонкого кишечника знижують вироблення ферментів. Іноді нездатність організму виробляти лактазу є вродженою, але для більшості людей лактазна недостатність розвивається природним чином. Після дворічного віку дитячий організм починає виробляти менше лактази. Однак у багатьох людей не з'являються симптоми непереносимості лактози, поки вони не стають старшими [34, 35].

Лактазну недостатність поділяють на первинну вроджену лактазну недостатність і вторинну лактазну недостатність. Лікування первинної непереносимості лактози триває все життя, а вторинної полягає у відновленні вироблення лактази в слизовій оболонці кишечника [36]. В даний час для лікування дітей із вторинною лактазною недостатністю в якості одного з лікувально-реабілітаційних заходів рекомендовано використовувати пробіотики, які включають мікроорганізми з високим рівнем активності β-галактази.

Пробіотики, що використовуються при ЛН, і здатність розщеплювати лактозу повинні активувати ферментну активність місцевої кишкової флори, а її інгредієнти не містять лактози [1]. Загалом, лактазна активність пробіотичних препаратів може гарантувати, що споживачі різного віку з вторинним ЛН зможуть розкласти належний рівень лактози в кишечнику та її всмоктування в кишечнику. У зв'язку з цим заслуговують на увагу препарати, що містять штами *Lactobacillus*, такі як «*Lacidophilus*» (Rosel Institute of Canada) і вітчизняний складний пробіотик «*Symbiter acidophilus*». Комплексний пробіотик Біфіформ® – це складний препарат у вигляді кишковорезинної капсули (виробник Ferrosan A/S, Данія), відноситься до сучасних пробіотиків, не містить лактози, може бути рекомендований для корекції вторинної ЛН, останньої розробки. Через мікробіоти тонкого кишечника [37, 38].

При розробці сучасної готової технології вона повинна відповідати вимогам технологічності, складності, екологічності, біологічної безпеки, енергоефективності. Використання в інгредієнтах дріжджів спеціальних мікроорганізмів з високою здатністю синтезувати β -галактозидазу має актуальність і практичне значення для виробництва малолактозних молочних продуктів [1]. Одним із найважливіших завдань молочної промисловості є створення нових видів молочної продукції, здатних задовольнити потреби різних груп населення (у тому числі хворих на різні захворювання та патології).

Як відомо, кисломолочні продукти містять менше лактози і багаті ферментами, вітамінами, антибактеріальними речовинами, пептидами, вільними амінокислотами, органічними кислотами, які підвищують їх біологічну активність і визначають специфічні, пробіотичні та необхідні технічні характеристики [1]. Тому створення закваски на основі мікроорганізмів з високою біохімічною активністю є однією з вимог до штамів, що входять до його складу.

Для зниження масової частки лактози в сирому молоці зазвичай застосовують такі методи [1]:

- ❖ Ферментативний гідроліз;
- ❖ Мембранний спосіб переробки молока.

Непрямою ознакою β -галактозидазної активності молочнокислих і біфідобактерій є їх кислото утворююча здатність, що дозволяє визначити кількість розкладеної лактози та індекс активності лактозного бродіння. В результаті було виявлено, що порівняно з *Bifidobacterium*, *Escherichia coli* та *Lactococcus* найбільш лактазо продукуючим штамом був *Streptococcus thermophilus* (рис. 1.5). Фермент, що продукується *Streptococcus thermophilus*, має високу активність і стабільність при рН молока 6,68 [39].



Рис. 1.5 *Streptococcus thermophilus*

Водночас, як показали F. Bouzar, J. Cernung, M. Desmazeaud, *S. thermophilus* (за активного росту) до настання стаціонарної фази росту майже вдвічі менше розщеплюють лактозу порівняно з лактобацилами *L. delbrueckii* (рис. 1.6), відповідно 14 – 28 % та 42 % від її початкової кількості у молоці [40]. Розщеплення лактози є першою стадією ферментування лактози. Лактоза транспортується у *S. thermophilus* за допомогою лактозопермеази (білка LacS), котра може діяти, як лактозо-галактозний антипортер або як галактозид-протонна симпортна система.



Рис. 1.6 *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*

Галактозо-негативний фенотип *S. thermophilus* призводить до надлишку галактозидів з будь-якого боку клітинної мембрани за розвитку його у молоці. Такий фенотип енергетично більш вигідний, крім того, функціонування LacS, як антипортеру, сприяє швидшому росту та розмноженню мікроорганізмів [41]. У такий спосіб β -D-галактозидаза розщеплює лактозу до глюкози та галактози. Глюкозний залишок вступає у реакції гліколізу з формуванням лактату, тоді як LacS за нормальних умов секретує галактозу назовні в обмін на лактозу [42]. Галактоза утворюється під час гідролізу лактози β -D-галактозидазою, при цьому глюкозний залишок майже повністю використовується клітиною для енергетичних та синтетичних потреб, а галактоза виводиться назовні завдяки функціонуванню LacS, як лактозогалактозного антипортера [1].

Виведення галактози в обмін на лактозу є швидким та енергетично вигідним процесом, тому не дивно, що більшості штамів *S. thermophilus* притаманний галактозо-негативний фенотип [42]. Проте повна утилізація галактози є бажанню у багатьох промислових виробництвах, зокрема в тих випадках, коли накопичення галактози у молоці або сирі призводить до розвитку дефектів молочних продуктів (потемніння продукту або росту небажаних гетероферментативних МКБ). Окрім того, споживання галактози у великій кількості є небезпечним, оскільки викликає накопичення токсичного галактіюлу у тканинах людини [41].

Виявлено штами біфідобактерій, які не тільки проявляють здатність продукувати β -галактозидази, що здатні розщеплювати лактозу, але також продукують суміш галактоолігосахаридів, яка містить до 35 % дисахаридів галабіози (Gal (α 1-6) -Gal). Останній, як відомо, є антиадгезивним засобом, здатним запобігати адгезії токсинів, наприклад шигатоксину, і патогенів, таких як *E. coli* [43]. Свідчення щодо продукування пропійновокислими бактеріями β -галактозидаз в науковій літературі відсутні, оскільки лактоза ними безпосередньо не засвоюється [43].

1.4. Бактеріальні препарати на основі β -галактозидаза, створені

біотехнологічними методами

1.4.1 Лацидофіл



Рис. 1.7 Лацидофіл

Діючою речовиною є *Lactobacillus rhamnosus* R0011, *Lactobacillus helveticus* R0052; 1 капсула містить не менше 2×10^9 КУО ліофілізованих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* R0011 (95%) та *Lactobacillus helveticus* R0052 (5%); допоміжні речовини: мальтодекстрин, магнію стеарат, аскорбінова кислота, желатин [44] (рис. 1.7).

Молочнокислі бактерії (*Lactobacillus*), присутні у травному тракті людини, є частиною природного екологічного бар'єра. Вони підтримують баланс кишкової мікрофлори, запобігають збільшенню кількості патогенних

гнильних мікробів у кишечнику, запобігають утворенню і впливу деяких ендотоксинів [44].

Також молочнокислі бактерії продукують перекис водню (H_2O_2), активують макрофаги і сприяють продукуванню субкласу імуноглобуліну G (IgG2), стимулюючи у такий спосіб активність імунних процесів. Сприяють

синтезу деяких вітамінів групи B (B1, B2, B6, B12, ніацину, фолієвої кислоти, пантотенової кислоти) [44]. Позитивно впливають на перистальтику

кишечнику, покращують перетравлювання білків та сприяють розщепленню лактози на глюкозу і галактозу, а також сприяють продукуванню молочної

кислоти. Пригнічують діяльність нітроредуктази, азоредуктази і бета-глюкуронідази, внаслідок чого зменшується продукування канцерогенних амінів [44].

Лактобактерії *Lactobacillus rhamnosus* R0011 і *Lactobacillus helveticus* R0052 повністю виводяться з кишечнику через 7–15 днів після прийому.

Окремі групи людей є більш чутливими до мікробних препаратів, зокрема до пробіотиків. Таким пацієнтам перед застосуванням лікарського засобу слід проконсультуватися з лікарем. До таких груп належать [44]:

- ❖ пацієнти з лихоманкою, блюванням або сильними болями в животі;
- ❖ пацієнти з гострим панкреатитом та іншими загрозливими для життя станами;
- ❖ пацієнти з наявними катетерами в центральній вені, після операції, особливо з міокардитом або ендокардитом, або після операцій на шлунково-кишковому тракті, операцій на серці або операцій у порожнині рота (включаючи видалення зубів), оскільки відкриті рани можуть бути входними воротами інфекції;
- ❖ пацієнти з наявністю крові в калі, особливо діти та люди літнього віку, оскільки проникні кишкові бар'єри є потенційними місцями, через які мікроби можуть потрапити у кров;
- ❖ пацієнти із дуже ослабленим та пригніченим імунітетом, включаючи пацієнтів з алотрансплантатами та пацієнтів, які пройшли радіо- або

хіміотерапію, та пацієнтів з недорозвиненою імунною системою, наприклад, передчасно народжені діти, хворі на СНД, лімфому або ті, що проходять тривалу кортикостероїдну терапію [44];

- ❖ діти із синдромом короткого кишечника. D-лактатний ацидоз є загрозою для дітей з синдромом короткого кишечника. У разі застосування лікарського засобу таким пацієнтам слід контролювати рівень лактату та одразу припинити лікування, якщо цей показник підвищився [44].

Можливість виникнення ускладнень стосується ослаблених пацієнтів.

Важливо відзначити, що лактобацилемія не становить загрози для здоров'я людини

Немає даних щодо застосування у період вагітності або годування груддю. Досліджень щодо впливу на фертильність не проводилося [44].

Лікарський засіб не впливає на швидкість реакції при керуванні автотранспортом або іншими механізмами.

1.4.2 Симбітер ацидофільний



Рис. 1.8 Симбітер ацидофільний

СКЛАД біомаса живих клітин симбіозу пробіотичних мікроорганізмів. 1 пакетик або флакон містить КУО/см³, не менше: лактобацили і лактококи - $1,0 \times 10^9$, біфідобактерії - $1,0 \times 10^8$, пропіоновокислі бактерії - $3,0 \times 10^7$, оцтовокислі бактерії - $1,0 \times 10^5$ [45] (рис.

1.8).

Рекомендовано вживати як дієтичну добавку до раціону харчування з метою загального зміцнення організму, поліпшення травлення, підтримки на нормальному рівні кишкової мікрофлори і її відновлення при дисбіотичних станах, а також для нормалізації мікрофлори кишечника під час і після прийому антибіотиків [45].

СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ

Вживати дітям від народження до 6 місяців по 1 пакетик або флакону 1 раз на добу під час їжі, дітям у віці від 6 місяців до 3-х років - 1 раз на добу під час або після їди. Курс споживання - 10 діб, в подальшому курс споживання необхідно узгоджувати з лікарем [45]. Перед застосуванням рекомендується консультація з лікарем.

Перед вживанням пакетик розрізати по позначці, а з флакона зняти металевий ковпачок і гумову пробку. Вміст пакетика або флакона розвести в (15-30) мл (1-2 столові ложки) кип'яченого молока або питної води кімнатної температури, ретельно перемішати і використати відразу після розведення [45].

ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ

Для максимальної ефективності інтервал між прийомом добавки дієтичної і антибіотиків має складати 3 години [45].

1.4.3 Біфіформ



Рис. 1.9 Біфіформ

Загальна характеристика

Основні властивості лікарської форми: капсули тверді кислотостійкі, молочно-білі з нейтральним запахом (рис. 1.9) [46].

Склад препарату

Кожна капсула містить:

1. діючі речовини: біфідобактерії (*Bifidobacterium longum*) - 107 КУО (живих мікроорганізмів) в 10,75 мг; ентерококи (*Enterococcus faecium*) - 107 КУО (живих мікроорганізмів) в 17,2 мг [46];
2. допоміжні речовини: глюкоза безводна, дріжджі, сироп бобів ріжкового дерева, лактулоза, желатин, метакрилатного сополімеру дисперсія, метакрилатний сополімер (тип А), тальк, магнію стеарат, поліетиленгліколь (макрогол 6000), олія сосна, моногліцериди ацетильовані, титану діоксид (Е 171) [46].

Форма випуску

Капсули тверді, кислотостійкі і 20 або о 30, у тубі. Код за АТС: А07F.

Механізм дії молочнокислих бактерій полягає в їх властивості відновлювати природну мікрофлору кишечника. Деякі молочнокислі бактерії можуть метаболізувати лактозу, таким чином, знижуючи утворення газів в

кишечнику [46]. Це зменшує метеоризм у пацієнтів з непереносимістю лактози.

Показання для застосування

Нормалізація кишкової флори при діареї, антибіотикотерапії, порушеннях харчування. Можуть приймати особи з непереносимістю лактози.

Застосовують внутрішньо. Капсулу слід ковтати, не розжовуючи. Дорослим і дітям віком від 2 років - по 1 капсулі 2 рази на добу, незалежно від прийому їжі. Доза може бути збільшена до 4 капсул на добу (по 2 капсули 2 рази на добу).

Немовлятам віком від 6 до 12 місяців: по 1 капсулі 2 рази на добу. Немовлятам віком від 2 до 6 місяців: по 1 капсулі 1 раз на добу. У немовлят застосовувати в першій половині дня. Щоб уникнути потрапляння капсули в дихальні шляхи у дітей віком від 2 місяців до 2 років, треба попередньо розкрити капсулу і змішати її вміст із їжею [46].

Для профілактики "діареї мандрівника" та антибіотик-асоційованої діареї: по 1 капсулі 2 рази на добу [46].

Оскільки лікарській засіб містить живі мікроорганізми, застосовувати його у пацієнтів зі зниженою імунною відповіддю можна тільки за призначенням лікаря, який визначить співвідношення користь/ризик [46].

Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодій

Молочнокислі бактерії чутливі до деяких антибіотиків. Тому при одночасному проведенні антибіотикотерапії доцільно приймати препарат Біфіформ® з інтервалом у кілька годин між прийомами антибіотиків [46].

1.5 Біотехнологічні аспекти застосування штамів мікроорганізмів з бета-галактозидазною активністю

В Україні, хоча використання продуктів з низьким вмістом лактози для забезпечення харчування пацієнтів з лактазною недостатністю є доцільним, економічним і технічно ефективним, обсяг продуктів з низьким вмістом

лактози (включаючи ряжанку) дуже обмежений. Враховуючи актуальність проблеми, актуальним завданням є розробка малолактозних молочних продуктів, рішення яких дозволить раціонально використовувати молочну сировину та розширити асортимент низьколактозних молочних продуктів з регульованим вуглеводним складом для людей інтолерантних до лактози [49].

Вміст лактози в молочних продуктах можна знизити різними способами: збільшенням масової частки інших інгредієнтів, у тому числі немолочних продуктів; видаленням частини молочного цукру (лактози) ультрафільтрацією для отримання білкового концентрату з низьким вмістом лактози; модифікацією або модифікація лактози. Розщеплюється на інші сполуки (глюкоза, галактоза) безпосередньо за допомогою фізичної або хімічної дії (ізомеризація, гідроліз) [50].

Найпоширенішими методами видалення лактози є фізичні (фільтрація або діаліз) та біологічні методи, в яких домінує гідроліз лактази на глюкозу та галактозу [17, 18]. Однак отримання продуктів з низьким вмістом лактози шляхом фільтрації вимагає великих капіталовкладень у спеціальне обладнання, таке як ультрафільтрація, нанофільтрація або електродіаліз, що є по кишені не всім молочним компаніям. Як більш дешевий і альтернативний метод отримання продуктів з низьким вмістом лактози та без лактози, ферментні методи можуть бути досягнуті шляхом використання штамів мікробів з β -галактозидазною активністю, складу таких штамів або комплексного використання штамів і ферментних препаратів β -галактозидаза.

Мікроорганізми, які можуть використовувати лактозу як єдине джерело вуглецю та енергії, є продуцентами β -галактозидази [49]. Активність β -галактозидази є одним із критеріїв відбору штамів до складу бактеріальних препаратів для кисломолочних продуктів спеціального призначення. Цей фермент є ключем до розкладання лактози в молочі дріжджовими мікроорганізмами [49].

Кисломолочні продукти займають важливе місце в харчуванні людей, особливо дітей, людей похилого віку та хворих. Люди з порушенням обміну лактози уникають вживання молочних продуктів, що значно обмежує їх раціон. Це явище в основному пов'язано з низьким рівнем лактази в тонкому кишечнику, якого недостатньо для використання лактози, що надається молоком. Кисломолочні продукти є більш прийнятними для цих людей, оскільки містять менше лактози (20-30% від початкового вмісту), а також є природним постачальником β -галактозидази (мікроорганізмів, що піддаються ферментації) [51, 52].

У наукових працях вітчизняних і зарубіжних вчених викладено теоретичні та практичні основи дослідження структури та особливостей ферментаційної культури з активністю β -галактозидази та її компонентів, що використовуються в технології виробництва йогурту: П. Л. Моллер, Ф. Йоргенсен, М. С. Колладо, Т. Н. Данильчук, Н. С. Рябой, В. І. Ганіна, Н. А. Дідух, Н. Ф. Кігель, С. Г. Даниленко та ін [49, 53, 54].



Рис. 2.4 *Streptococcus thermophilus*

Використання в інгредієнтах дріжджів спеціальних мікрорганізмів з високою здатністю синтезувати β -галактозидазу має актуальність і практичне значення для виробництва малолактозних молочних продуктів. Створення нових молочних продуктів, здатних задовольнити потреби різних груп населення (у тому числі хворих на різні захворювання та патології), є одним із найважливіших завдань молочної промисловості [49].

Є дані [24, 28], що *Streptococcus thermophilus* (рис. 2.4) має найбільший потенціал ферментації лактази серед *S. lactis*. Фермент β -галактозидаза, що виробляється *S. thermophilus*, більш активно гідролізує молочну лактозу, демонструючи високу активність і стабільність. Чиста культура *Streptococcus thermophilus* ферментує глюкозу шляхом гліколізу з утворенням ізомерів L (+)-молочної кислоти. Галактоза, що утворюється під час ферментативного гідролізу лактози, не утилізується цими мікроорганізмами і залишається в продукті. Масова частка лактози, що розкладається *S. thermophilus*, становить 0,8-1,2%. Залишки лактози в кисломолочних продуктах, отриманих шляхом ферментації цих культур, становлять 3,6-3,9% [55].

Дуже перспективним є використання штамів *Bifidobacterium*, здатних продукувати β -галактозидазу, у виробництві кисломолочних продуктів для більш повної ферментації лактози в кисломолочних композиціях. β -галактозидаза *Bifidobacterium* не тільки проявляє здатність продукувати β -галактозидазу здатну розщеплювати лактозу, але також виробляє суміш преботиків, яка містить до 35% галактозидази ($\text{Gal}(\alpha 1-6)\text{-Gal}$) [55]. Останній є відомим антиадгезивним засобом, який запобігає адгезії токсинів, таких як цитотоксини, і патогенів, таких як *E. coli*.



Рис. 2.5 *Bifidobacterium adolescentis*

Крім того, також встановлено, що завдяки впливу β -галактозидази на лактозу утворюватимуться важливі продукти трансгліколізу біфідобактерій, що підвищує біохімічну активність біфідобактерій та стимулює їх розвиток [56]. Вчені досліджували біфідобактерію, яка має найбільшу енергію при

низькій активній кислотності. В результаті адаптивної селекції отримано кислотостійкі штами *B. adolescentis* (рис. 2.5) KS-1 і *B. bifidum* KS, які можуть виживати протягом 2 годин при pH 2,0. За встановленими фізіолого-

біохімічними характеристиками відібрано адаптований до підвищеної кислотності штам *B. adolescentis* KS-1, який передбачається використовувати як закваску у виробництві пробіотиків та малолактозних кисломолочних продуктів [53].

Молоко не є природним середовищем проживання пробіотичних культур *Bifidobacterium*, тому їх промислове використання вимагає великої селекційної роботи для адаптації цих культур до молока. Крім того, для стимуляції росту біфідобактерій у молоці широко використовуються різні біфідус-фактори — фруктоза, глюкоза, лактулоза, інулін, морквяний сік, поліненасичені жирні кислоти тощо. Поєднання двох методів стимуляції

росту та розвитку біфідобактерій у молоці (адаптація та введення біфідобактерій) дозволяє отримати кисломолочні продукти з високими пробіотичними властивостями та низьким рівнем лактози [56].



Рис. 2.6 *Bifidobacterium bifidum*

Існують винаходи штамів *Bifidobacterium bifidum* (рис. 2.6) композиції, що містять галактоолігосахаридів, їх застосування та способи отримання речовин, що стимулюють ріст біфідобактерій. Даний винахід відноситься до

нового штаму *Bifidobacterium bifidum*, який продукує фермент β -галактозидазу, який проявляє нову галактозидазну активність, завдяки якій лактоза перетворюється в нову суміш галактоолігосахаридів.

Найперспективнішими продуктами для функціональної молочної технології є концентрати лактобактерій та штами бифідобактерій, які відповідають вимогам пробіотиків і мають високий технічний потенціал [55].

Використовуйте штами *S. thermophilus* ST 80, *L. acidophilus* LA 02, BC LYOVAC KEFIR 22, BC FD DVS Yo-Flex 180 та BC LYOVAC YOYO 60 з високою β -галактозидазною активністю, вимірюють штами бифідобактерії *B. longum* BL 03, *B. breve* BR 03 використовуються для виробництва ферментованих функціональних молочних продуктів для лікування цукрового діабету [57].

Розроблено спосіб отримання комплексів біологічно активних речовин, що включають β -галактозидазу, галактоолігосахаридів та полісахариди. Цей метод дозволяє одночасно використовувати мікроорганізм для отримання олігосахаридів і полісахаридів у біотехнологічному процесі. Завдання полягає в тому, щоб приготувати в рідкому середовищі фізіологічно активний посів культури дріжджів *Cryptococcus flavescens* (рис. 2.7) ВІМ У228-D-продуценти β -галактозидази, галактоолігосахаридів і полісахаридів, у присутності енергії, молока або відходів, що утворюються при переробці [55].



Рис. 2.7 *Cryptococcus flavescens*

В республіці Білорусь було розроблено спосіб отримання позаклітинної β -галактозидази, отриманої з бактерій, що характеризується високою сумарною і питомою активністю, а також спрощує і знижує вартість отримання [55]. Завдання полягає в тому, щоб приготувати посів фізіологічно

активного продуцента *Artarobacter sulfophilus* LF-GAL- β -галактозидази на середовищі, що містить лактозу, і провести його в ферментаційній посудині, що містить живильне середовище, що містить вуглекислий газ та джерело азоту. Поглиблене навчання досягати. Температура 5 і 27-29°C не перевищує 3 діб.

Досліджено штами мікробів з β -галактозидазною активністю та відібрано штамп з найбільшим урожаєм – дріжджів *Kluyveromyces* (рис. 2.8).

Досліджено основні показники отриманої лактази: сумарна β -галактозидазна активність сирого ферменту становила $(3,36 \pm 0,05)$ та $(4,44 \pm 0,05)$ од/білок у гетерогенних та гомогенних культурах відповідно [58].



Рис. 2.8 *Kluyveromyces*

Коли для біотехнологічної обробки молока використовується чиста мезофільна культура *Lactococcus lactis* або змішана культура, молочна лактоза розщеплюється на моносахариди – глюкозу та галактозу, які ферментують до L і D ізомерів молочної кислоти. Оскільки межа утворення кислоти відносно низька при використанні в закваски мезофільного *L. lactis*, виходить кисломолочний продукт з низькою кислотністю.

Масова частка лактози, яку використовує мезофільний *L. lactis*, становить лише 0,40-0,45%, а вміст лактози в кисломолочних продуктах коливається в межах 4,0-4,5% [36]. Описує вивчення мікробної активності β -галактозидази, враховуючи вплив субстратів і метаболітів на синтез і каталітичну активність β -галактозидази, а також кінетику β -галактозидази,

індукованої *L. mesophila*. Бактерії рослин і пропіоновокислі рослиноїдні бактерії Р. Дослідження показали, що згущені сироваткові олігосахариди можуть бути використані як фактори росту для мікроорганізмів з низькою активністю β -галактозидази [37].

Для підвищення активності β -галактозидази штамів у біотехнології така методика використовується у вигляді комбінації штамів мікробів, що володіють β -галактозидазною активністю, або комбінації цих штамів і ферментних препаратів β -галактозидази. Симбіотичну взаємодію між *L. bulgaricus* і *S. thermophilus* можна пояснити їх метаболізмом, дією та розвитком. *L. bulgaricus* має значну протеолітичну активність і синтезує амінокислоту валін, тим самим стимулюючи розвиток *S. thermophilus*.

S. thermophilus випереджає болгарську паличку в процесі свого розвитку, знижуючи при цьому окислювально-відновний потенціал і рН молока, створюючи таким чином сприятливі умови для розвитку *L. bulgaricus* [55]. Йогурт, отриманий шляхом сквашування молока цими мікроорганізмами, має низький вміст лактози, пробіотичні властивості, нормалізацію кишкової флори, зниження рівня холестерину, виведення токсинів та активізації імунної системи [56].

Вчені розробили метод, який дозволяє безпосередньо наносити бактеріальні концентрати на продукти спеціального призначення. Отримання бактеріального концентрату включає внесення в живильне середовище ацетату натрію і Твін 80 як активатора росту молочнокислих бактерій, а в якості насіння пробіотичного штаму *L. acidophilus* УКРМ В-7771. Співвідношення 733 1:1:1. Даний винахід дозволяє отримувати біологічно активні бактеріальні концентрати для безпосереднього застосування для виробництва продуктів спеціального призначення з високим вмістом пробіотичних культур, вільних амінокислот, у тому числі незамінних, з низьким вмістом лактози та холестерину.

Вироблений за цим методом ферментований продукт рекомендовано використовувати для профілактики для нормалізації кишкової флори,

поліпшення холестеринового обміну, поліпшення процесу травлення [55]. Однак, з точки зору непереносимості лактози, використання однієї культури штамів з активністю β -галактозидази та комбінації цих штамів, як правило, недостатньо. Для подальшого зниження вмісту лактози рекомендується додатково використовувати ферментний препарат β -галактозидази, який може забезпечити гідроліз лактози до заданої величини, яка становить 0,1-0,01%. Цей метод особливо підходить для отримання кисломолочних продуктів без лактози.

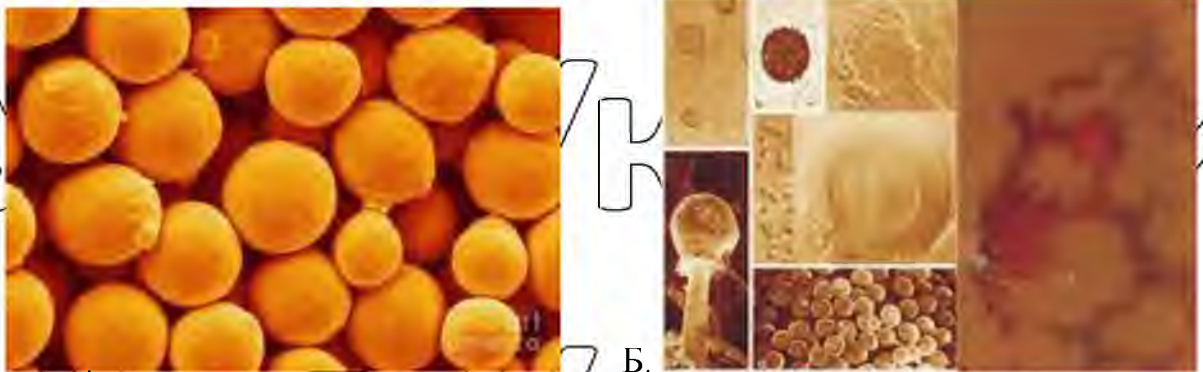


Рис. 2.9 А. *Kluyveromyces lactis*; Б. *Mucor pusillus*

Для ферментативного гідролізу лактози в молоці, продуктах на основі незбираного та знежиреного молока або сироватки чи сиру отримують нейтральний ферментний препарат β -галактозидази, які отримують з культурних дріжджів роду *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, грибів роду *Penicillium terfikowskii*, *P. multicolor*, *P. canescens*, *Mucor pusillus*, *Alternaria tenuis* [55, 59] або бактеріальних культур *Escherichia coli*, *Lactobacillus thermophilus*, *Leuconostoc citrovorum* [55], оптимальні умови дії для яких знаходяться в діапазоні рН 6,0–8,0 (рис. 2.9). Для гідролізу лактози в кислій сироватці рекомендується використовувати ферментні препарати грибного походження, які виробляються промисловими штамами міцеліальних грибів *Aspergillus niger* (рис. 2.10) і *Aspergillus oryzae*, оскільки їх оптимальні умови знаходяться в межах рН 3,0-5,0 од., що відповідає рівню активної кислотності кислої молочної сироватки [60].

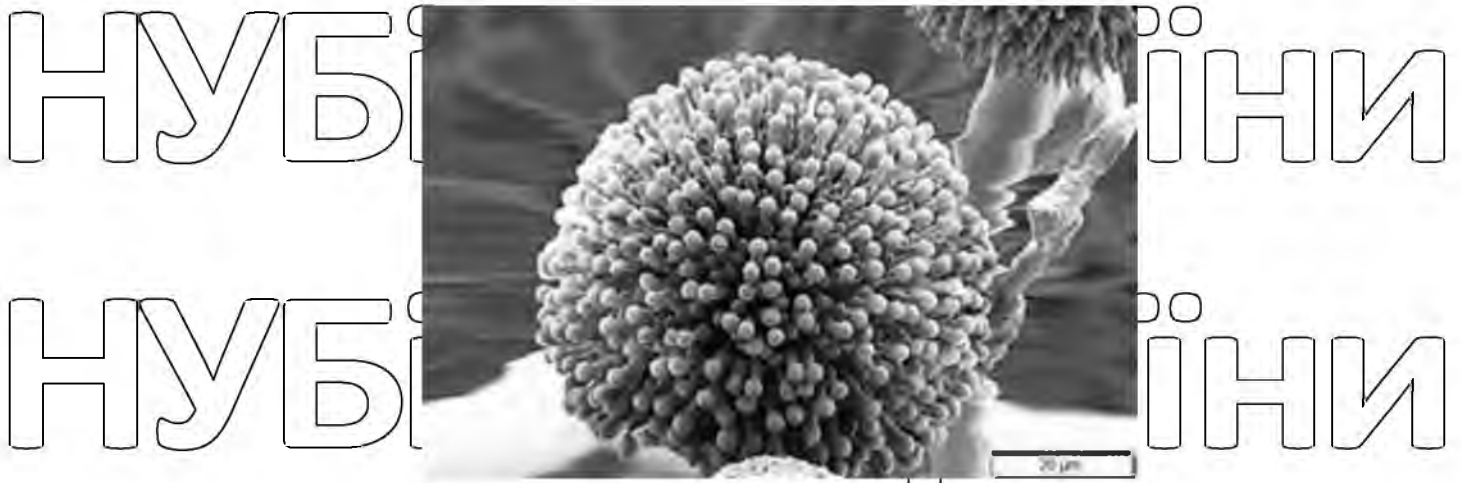


Рис. 2.10 *Aspergillus niger*

Вченими розроблено спосіб виробництва низьколактозного біфідовмісного кисломолочного напою на основі гідролізованого нормалізованого гомогенізованого пастеризованого молока, в якому за рахунок використання ферментного препарату β -галактозидази та змішаних культур пробіотичних бактерій *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* та *Bifidobacterium breve*, активізованих у молоці, та введення до продукту пребіотика забезпечено одержання низьколактозного біфідовмісного кисломолочного напою з тривалим терміном зберігання [55].

Спосіб отримання низьколактозного біфідовмісного йогурту з підвищеними функціональними властивостями на основі стандартизованої однорідної пастеризованої суміші гідролізу, в якій за рахунок використання β -галактозидази і пробіотиків *B. bifidum*, *B. longum* та *B. adolescentis*, придатна для отримання змішаної культури пробіотичних продуктів, забезпечує виробництво функціонального низьколактозного біфідовмісного йогурту [55].

Розроблено малолактозний кисломолочний продукт, яке являє собою молоко, отримане шляхом комплексної мембранної обробки (нанофільтрація та електродіаліз) та демінералізована сироватка за допомогою штамів β -галактозидази дріжджів та *S. thermophilus*. Поєднання ферментативного гідролізу лактози в суміші та подальшої ферментації бактеріальним

препаратом *S. thermophilus* дозволяє отримати кінцевий продукт з масовою часткою лактози менше 1% [55].

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Умови проведення науково-дослідницької роботи та об'єкти досліджень.

Інститут продовольчих ресурсів Національної академії аграрних наук України



Рис. 2.1 Головний корпус інституту

Інститут продовольчих ресурсів НААН є провідною організацією з наукового забезпечення технологічного розвитку харчової та переробної промисловості України та вирішення економічних проблем розвитку цих галузей (рис. 2.1). Ця наукова установа створена на базі Науково-дослідного інституту технології молока та м'яса шляхом розширення сфери діяльності у 2012 році. Її діяльність полягає у проведенні досліджень, впровадженні та впровадженні наукових розробок у виробництво з метою раціонального використання сировини, підвищення ефективності виробництва та забезпечення належної якості та зміцнення конкурентоспроможності вітчизняної продукції формують ринкові відносини у м'ясопереробній, молокопереробній, цукровій, алкогольній, хлібобулочній, кондитерській та інших підгалузях української харчової та переробної промисловості.

Статутними документами НААН визначено основні напрями діяльності права інтелектуальної власності як розробка та вдосконалення технології та обладнання виробництва м'ясо-молочної продукції (у тому числі дитячого харчування), харчових добавок і технології приготування бактерій для виробництва харчових продуктів, тварин і рослин. сировина. Дослідження хімічного складу та властивостей; інноваційна технологія виробництва високоякісної їжі; технологія використання нетрадиційної сировини для виробництва покращеної та профілактичної їжі; нові методи дослідження сільськогосподарської сировини та продуктів харчування; покращення контролю якості харчових продуктів; вирішення питань переробки промисловість та продовольчі ресурси. Економічні питання (ринки, економічна ефективність виробництва, державна підтримка, ціноутворення, інфраструктура, моніторинг тощо). Успішний професійний і науковий потенціал колективу, у тому числі 11 кандидатів наук, 28 кандидатів наук, 1 академік та 4 члени-кореспонденти НААН, можуть успішно виконувати поставлені завдання.

Найуспішнішими прикладами розвитку ІТР НААН є технологія та формула дитячого та дитячого кисломолочного продукту «Віталакт», сметани вареної з приправою на стадії формування структури продукту та кисломолочного продукту «Геролакт». Виробляється за ліцензією «Gaio». М'ясопереробні підприємства України активно впроваджують розроблені фахівцями інституту технології виробництва м'ясних продуктів традиційного асортименту – варених, напівкопчених, варено-копчених ковбас, напівфабрикатів та ін., якість яких відповідає високим вимогам національних стандартів України. Інститутом розроблено важливу для цукрової галузі технологію спільного виробництва цукру і біоетанолу в умовах цукрового заводу, яку можна впроваджувати як при будівництві нових, так і при реконструкції діючих підприємств.

Протягом багатьох років одним із важливих напрямків діяльності ІТР НААН був відбір нових штамів мікробів, що мають промислове значення,

для застосування в біотехнології м'ясо-молочного виробництва. Виробництво розроблених науковцями інституту препаратів контролюється створеним НІР НААН Національним дослідницьким підприємством

бактеріального бродіння «Іпровіт», яке добре знають вітчизняні виробники та батьки, які піклуються про здоров'я та харчування своїх дітей.

Вибір біологічного об'єкту

Основними продуцентами ферменту β -галактозидаза, що не потребують зміни генетичних характеристик, а також є найближчими людській мікрофлорі є молочно-кислі бактерії.

Морфолого-культуральні ознаки. *Lactobacillus acidophilus* грамм позитивна паличка з закругленими кінцями, розміром зазвичай 0,6-0,9x1,5-6 мкм, розташовуються поодинокі, парами або у вигляді коротких ланцюжків.

Нерухомі. Джгутиків не утворюють. На відміну від *L. bulgaricus* і *L. lactis* не містять гранул метакроматину. Не утворюють спор.

Колонії зазвичай шорсткі (R-форма). Мікроскопічне дослідження зазвичай виявляє скручені або пухнасті волокнисті виступи з темної волокнистої масою в центрі колонії. Глибинні колонії мають неправильну форму з радіальними або розгалуженими виступами. Не мають характерного забарвлення (рис. 2.2).



Рис. 2.2 Бактерії *Lactobacillus* навколо вагінальних епітеліальних клітин.

Фізіолого-біохімічні ознаки. Ацидофільна паличка є факультативним анаеробом. Хемоорганогетеротроф. Не зростає при 15 °С, може не рости при 22 °С; зазвичай зростає при 45 °С і може рости при 48 °С, оптимум в межах

35-38 °С. Зростає при початкових значеннях рН від 5,0 до 7,0 з оптимумом в межах рН 5,5-6,0. Для росту потребують присутності ацетату або

мевалонної кислоти, рибофлавіну, пантотената кальцію, ніацину і фолієвої кислоти. Не потребують добавок тіаміну, піридоксалу і тимідину. Зазвичай

не потребують вітаміну В12 (Ціанкобаламін). Мутантні штами можуть потребувати дезоксирибозидів. Енергію отримує шляхом

гомoferментативного бродіння з утворенням DL-молочної кислоти.

Пептидолікан клітинної стінки відноситься до типу L-лізин-D-аспартат; тейхоева кислота зазвичай відсутня, у деяких штамів виявляються

невеликі кількості гліцерин-тейхоевої кислоти. Клітинні стінки не містять якихось помітних гексоз і пентоз. Штами проявляють серологічну

різноманітність і не дають групових реакцій. Слід додати до наведеного опису, що дослідники відзначають високу стійкість штамів ацидофільної

палички до лужної реакції середовища (зростання при рН 8,3), наявності в середовищі 0,4% фенолу, жовчі (20%) або кухонної солі (2%) і пов'язують цю

особливість з її адаптацією до специфічної ніші природного місцеперебування.

Ще одна властивість, характерна для ацидофільної палички - здатність пригнічувати ріст ряду представників патогенних, умовно-патогенних і

технічно-шкідливих мікроорганізмів. Як відомо, в основі цієї властивості лежать механізми неспецифічного і специфічного антагонізму. Тут, однак,

необхідно відзначити, що неспецифічний антагонізм проявляють не тільки штами *L. acidophilus*, але і багато інших груп і види молочнокислих бактерій,

тоді як специфічний антагонізм, це скоріше штамова, ніж видова властивість ацидофільної палички.

Середовище існування. Природним місцем життя ацидофільної палички є травний і урсгенітальний тракти ссавців, включаючи людину, і птахів.

Bifidobacterium bifidum. Морфологічні особливості. Ці

неспороутворюючі грампозитивні, нерухомі анаеробні мікроорганізми можуть виробити природні антибіотичні речовини, які вбивають бактерії, непотрібні для людини (рис. 2.3). Однак сам пробіотик *Bifidobacterium* надзвичайно чутливий до дії інших антибіотиків, що є лікарськими засобами [62].

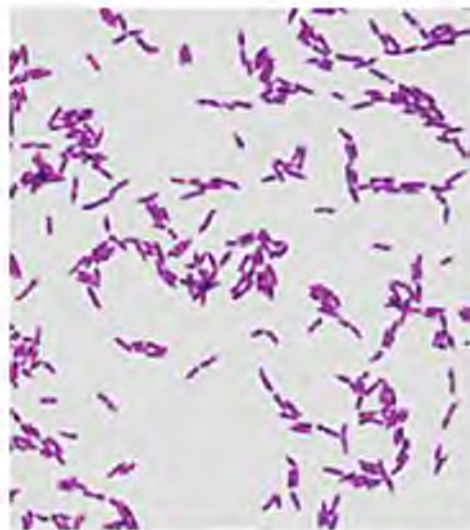


Рис. 2.3 *Bifidobacterium bifidum*

B. bifidum вперше була виділена з фекалій немовлят на грудному вигодовуванні в 1899 році. Однак через морфологічні та фізіологічні особливості ці бактерії спочатку були класифіковані як *Lactobacillus* і не були визнані як окремий рід до 1974 року [62]. Пізніше з'явилася назва *Bifidobacterium*.

Ці бактерії мають паличкоподібну форму, і більшість популяцій біфідобактерій людини знаходяться в товстій кишці, частіше в нижній частині кишечника; у грудному молоці, зазвичай у піхві.

Фізіолого-біохімічні ознаки. Біфідобактерії краще ростуть на слабокислих середовищах з рН 6,3-6,5. Зростання припиняється при рН 3,6-4,0.

залежно від конкретного виду та штаму. Оптимальний рівень рН для штаму *B. bifidum* лежить у межах 7,2-7,4 [63].

Більшість штамів біфідобактерій аеротолерантні, однак оптимальне зростання спостерігається при анаеробних або мікроаерофільних умовах.

Стимулювати зростання може збільшена концентрація вуглекислого газу.

Більша кількість біфідобактерій краще зростає при мезофільних температурах з верхнім кордоном близько 40 °С. Оптимальний рівень зростання для штаму *B. bifidum* становить 37±1 °С [63].

Штам *B. bifidum* має високий ступінь антагоністичної активності, що пов'язано з інгібуючою дією молочної та оцтової кислоти, бактеріоцинів, лізоциму та іншими метаболітами, які здатні знижувати рН, а також конкуренцією за сайти прикріплення на оболонці різних відділів шлунково-кишкової.

Streptococcus thermophilus. Морфологічні і фізіологічні особливості. *S. thermophilus* також відомий як *S. salivarius* subsp. *thermophilus* грам-позитивна бактерія та ферментативний факультативний анаероб із групи *viridans*. Він негативний на цитохром, оксидазу та каталазу і позитивний на альфа-гемолітичну активність. Він нерухливий і не утворює ендоспор. Рух здійснює за допомогою війок.

Вона також класифікується як молочнокисла бактерія. *S. thermophilus* міститься в кисломолочних продуктах і зазвичай використовується у виробництві йогурту поряд з *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ці два види є синергічними, і *S. thermophilus*, ймовірно, забезпечує *L. d. bulgaricus* з формієвою кислотою та мурашиною кислотою, які він використовує для синтезу пуринів. *S. thermophilus* має оптимальний діапазон температур росту 35–42 °С, тоді як *L. d. bulgaricus* має оптимальний діапазон 43–46 °С

2.2 Обґрунтування способу культивування

Культивування молочнокислих бактерій здійснюється глибинним способом в ферментерах. Таким чином забезпечуються анаеробні умови, так

як вони є анаеробом. Також глибоке культивування має ряд переваг перед поверхневим і дозволяє:

- значно зменшити виробничі площі;
- повністю автоматизувати і механізувати процес;
- покращити санітарно-гігієнічні умови праці;

для його культивування аерація не потрібна.

Вирощування культури здійснюється періодичним способом, для забезпечення максимального виходу біомаси, за рахунок рівномірного розподілення клітин в середовищі. Також перевагою періодичного культивування є зручність регулювання рН середовища.

Оптимізована температура для культивування *L. acidophilus* - 37°C, а оптимальне значення рН близьке до нейтрального (рН 6-6,5), тож є ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Тому для запобігання цього потрібно провести стерилізацію обладнання і комунікацій поживного середовища. [47].

Отже, процес вирощування даного продуцента здійснюється за періодичного глибокого культивування в анаеробних та стерильних умовах.

2.3 Приготування, стерилізація поживних середовищ та умови культивування.

Поживне середовище МРС (г / л):

- ❖ глюкоза – 6.9;
- ❖ дріжджовий екстракт – 38;
- ❖ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.6;
- ❖ $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 0.03;
- ❖ Ацетат натрію- 1;
- ❖ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.03;
- ❖ K_2HPO_4 - 0.16;
- ❖ KH_2PO_4 - 0.5

Для приготування поживного середовища, для культивування в колбах наведемо розрахункову таблицю. Для зменшення процесу виробництва об'єднаємо композиції солей Б і В.

Приготування і стерилізація композиції А.

За допомогою аналітичних терезів зважуємо компоненти композиції А, та переміщуємо в теплою водою у колбі, стерилізація буде проходити в автоклаві за температури 112°C (продовж 30 хв [48]).

Приготування і стерилізація композиції Б.

Композиції солей Б відважують на аналітичних терезах та засипають у колбу та наповнюють теплою водою для кращого розчинення компонентів, через дуже малу кількість солі не вступають в реакцію, тому додавання титрантів до композиції на даному етапі не є обов'язковим [48]. Стерилізація солей проходить за температури 131°C впродовж 30 хв. Статистичну обробку даних проводили в таблиці ексель.

Умови культивування [48]

❖ pH= 6.0-6.5

❖ T=37°C,

❖ t=36 год.,

Методика одержання нової бактеріальної закваски .

Приготування живильного середовища. В 70 дм^3 водопровідної води, розчинили 2100 г сухого знежиреного молока, встановили pH 6,8, суміш нагріли до 55°C , внесли 12 г протосубтиліну з активністю 70 од. і витримували в цих умовах 2,5 години. Після гідролізу до середовища додавали 350 г лактози, 350 г тризаміщеного цитрату натрію, 140 г екстракту дріжджів, 1,4 л кукурудзяного екстракту, 35 г 7-водного сульфату магнію та 3,5 г 4-водного сульфату марганцю, 7 г 7-водного сульфату заліза (III).

У середовищі додаванням 40% розчину гідроксиду натрію pH доводили до 7,8 і стерилізували при 121°C протягом 30 хв, активна кислотність

середовища після стерилізації становила 6,8 од. рН, після стерилізації, поживне середовище поступово охолоджували до 35 °С. Окремо приготували дві ємності розчину глюкози - 350 г розчинили в 2000 см³ дистильованої води і розчину аскорбінової кислоти - 35 г розчинили в 700 см³ дистильованої води і стерилізували при (112 ± 1) °С протягом 15 хв.

Готують розчин знежиреного молока - 100 г молока розчиняють у 900 см³ води і стерилізують при (121 ± 1) °С протягом 15 хв. У підготовлене живильне середовище додавали по одній ємності розчину глюкози та розчину аскорбінової кислоти. Активна кислотність середовища становила 6,5 од. рН. Середовище охолоджували до (37 ± 2) °С. Інокулянт біфідобактерій готували в гідролізованому молочному середовищі шляхом культивування при (37 ± 1) °С трьох видів біфідобактерій *B. bifidum* ІМВ В-7032, *B. longum* ІМВ В-7033, *B. adolescentis* ІМВ В-7035 у співвідношенні 1: 1: 1 протягом 16

год. Інокулянт бактерій *Lactobacillus acidophilus* R0052 готували шляхом культивування цих бактерій у лактатному рідкому середовищі при (30 ± 1) °С протягом 36 годин. Інокулянт термофільних молочнокислих бактерій готували шляхом культивування 3 штамів *S. salivarius* ssp. *thermophilus* ІМБ В-7179, ВКПМ В-7773, В-7774 у співвідношенні 1:1:1 в знежиреному молоці при температурі (37 ± 1) °С протягом 8 год.

До живильного середовища додавали 1 дм³ розчину знежиреного молока, 3,5 л посіву біфідобактерій та 1,4 л лактобацил. Накопичення бактеріальної мікрофлори проводили при (37 ± 1) °С протягом 7 годин. Потім внесли 2,1 л посіву термофільних молочнокислих бактерій, додали другу ємність з розчином глюкози 350 г у 2000 см³ дистильованої води.

Потім при спільному культивуванні накопичення біомаси бактеріальної мікрофлори продовжували при (37 ± 1) °С протягом 7 годин. Під час накопичення біомаси культуральну рідину розкислювали 25% водним розчином аміаку до рН 6,8. Після закінчення росту культуральну рідину охолоджували до 12 °С, нейтралізували до рН 6,6 і центрифугували.

Отриману біомасу змішують у співвідношенні 1:2 або 1:3 із захисним середовищем. Утворилася суспензія біомаси.

З окремих стерильних розчинів готували 2 дм³ захисного середовища з розрахунку: 200-300 г сахарози та 60-80 г желатину, розчиняють в 1,0 дм³ дистильованої води і стерилізували при $(115 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 15 хв.; 100 г сухого знежиреного молока в 1,0 дм³ водопривідної води, стерилізували при $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 15 хв. Суспензію біомаси розливали в кювети висотою шару 6 мм, заморожували і сушили в сублимаційній сушарці. 1 г сухих дріжджів містить $1 \cdot 10^{10}$ КУО біфідобактерій, $1 \cdot 10^{10}$ КУО молочнокислих бактерій і $1,5 \cdot 10^9$ КУО проміоновокислих бактерій. Закваска має високу активність, 1 г закваски заквашує 1 л молока за (7 ± 1) год. Кінцевий продукт має приємний смак і зберігається протягом 7 днів без істотних змін при температурі $(3 \pm 1)^\circ\text{C}$.

2.4 Перевірка наявності бета-галактозидазної активності молочнокислої закваски

Активність бета-галактозидази оцінювали за допомогою хромогенного субстрату о-нітрофеніл-бета-D-галактопиранозиду. Одиницею ферментативної активності була кількість ферменту, що каталізує його гідроліз, 1,0 мкМ з утворенням забарвленого о-нітрофенолу при рН 4,6 та 30^oС протягом 1 хвилини. Інтенсивність кольору реєстрували при довжині хвилі 0,420 нм. Активність бета-галактозидази вимірюють за допомогою хромогенного субстрату о-нітрофеніл-бета-D-галактопиранозиду (ONPG). 1 мл ферментованого продукту додають до 50 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0), який містить 0,001 М MgSO₄ і 0,05 М бета-меркаптоетанолу.

Потім до 1 мл розведеного зразка додають 2 краплі хлороформу та 1 краплю 0,1% додецилсульфату натрію. Зразок енергійно перемішували протягом 10 секунд і поміщали на 5 хв у воду при 28^oС. Реакцію починають додаванням 0,2 мл ONPG (4 мг/мл) і енергійним перемішуванням протягом 10 секунд. Помістять на 10 хвилин у воду з температурою 28^oС. реакцію

зупиняють, додаючи розчин 0,5 мл 1M Na₂CO₄, отримуючи таким чином рН 11. Таким чином інактивують бета-галактозидазу. Перед вимірюванням оптичної густини розчин центрифугують при 16266xg протягом 15 хвилин.

Оптичну густину вимірюють при довжині хвилі 420 нм.

Визначте одиниці активності ферменту в мл розчину за наступною формулою.

$$\text{Бета-галактозидаза (ррп /мл)} = 1000 (A_{420} / (t \cdot v)), \quad (2.1)$$

де t - час реакції в хвилинах, v - об'єм зразка, A - оптична густина.

Примітка. а) бета-меркаптоетанол додають до реакційноздатного буфера для стабілізації ферменту. Важливим компонентом бета-меркаптоетанолу є тіолова (SH) група. Тіоли реагують з киснем у присутності повітря і через деякий час окислюються (інактивуються). Через це готувати і зберігати при температурі 4°C слід тільки добову порцію.

б) (проникність) клітин підвищується додаванням хлороформу та додецилсульфату натрію (або лаурилсульфату натрію).

Використання цукрів. Здатність досліджуваних штамів *S. thermophilus* до утилізації різних цукрів визначали в середовищі ГДК (de Man, Rogosa and Sharpe medium), пропіоновокислих бактерій – на лактатному, а бифідобактерій – на гідролізатно-молочному середовищі з єдине джерело вуглеводів за кінцевою кислотністю живильне середовище (рН).

Рівень споживання лактози. Активність споживання лактози досліджували після 5 годин культивування бактерій у відновленому знежиреному молоці за допомогою високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі LC-6A (Shimadzu) на колонці SCR-101N (Shimadzu). Елюентом була деіонізована дегазована вода, температура колонки термостата - 60°C, детектора - рефрактометрична, швидкість елюювання - 0,2 мл/хв.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

НУБІП України

3.1 Відновлення музейної культури та перевірка мікробіологічної чистоти культури

Актуальним є дослідження β -галактозидазної активності окремих штамів та їх композицій, як основної складової для заквашувальних культур. Отримані дані можуть бути використані для відбору мікроорганізмів для створення бактеріальних комбінацій заквасок. Результати виконаних досліджень дозволять отримати молочні продукти зі зниженим вмістом лактози.

Враховуючи те, що глюкоза, утворена внаслідок гідролізу лактози, є основним енергетичним джерелом живлення мікроорганізмів, важливо було дослідити активність споживання лактози молока штамми, які вже застосовують у виробництві кисломолочних продуктів або можуть бути використані для ротації.

Але, перед тим, як почати основний етап роботи з культурами, їх потрібно було відновити (рис. 3.1), за допомогою м'ясо-пептонного бульйону. Таким чином запобігають осмотичному шоку в клітинах і насичують їх потрібними поживними речовинами.



Рис. 3.1. Відновлення музейної культури.

Після відновлення культури, проводили її семикратне розведення для подальшого висіву на чашки Петрі (рис. 3.2, 3.3) та проведення мікробіологічного контролю.



Рис. 3.2, 3.3. Колонії молочно-кислих бактерій роду *B. bifidum*, *L. acidophilus*.

Наступним етапом була перевірка мікробіологічної чистоти культури та відсутності представників сторонньої мікрофлори (рис. 3.4, 3.5, 3.6).

НУБІП України

НУБІП України

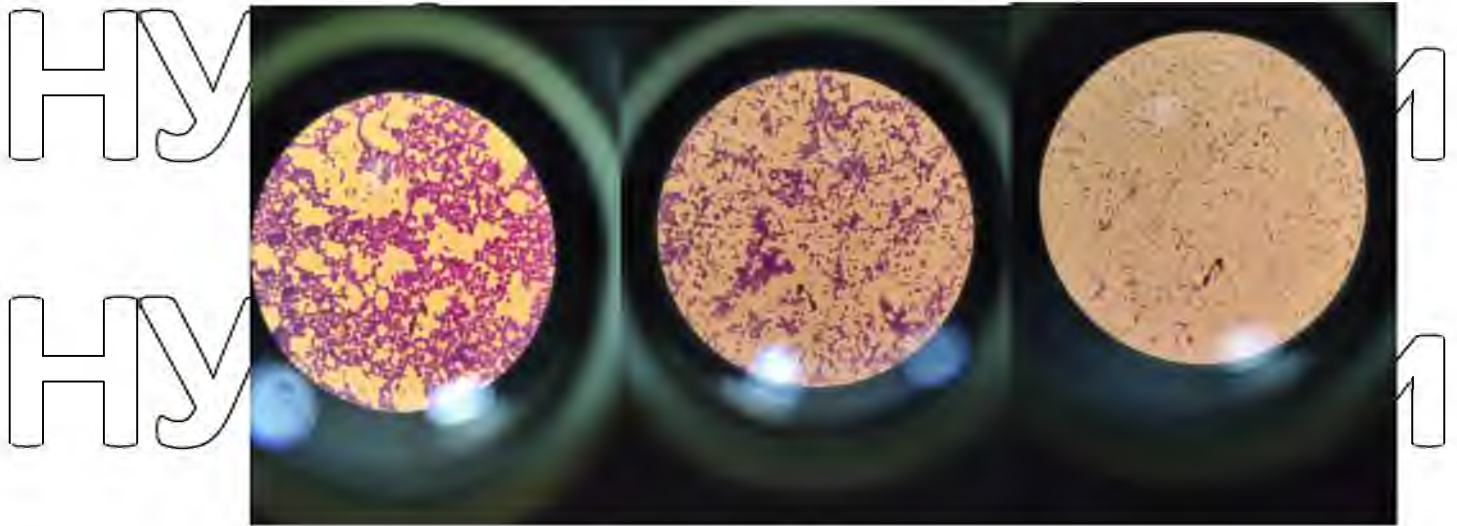


Рис. 3.4, 3.5, 3.6. Мікроскопія зразків молочно-кислих бактерій.

Далі було проведено порівняльні дослідження щодо вивчення можливостей штамів мікроорганізмів різних родів до синтезу ферменту β -галактозидази (діагр.3.7). Результати формувалися за таким списком:

- 1- *S. thermophilus* 2176,
- 2- *S. thermophilus* 2120,
- 3- *S. thermophilus* 2138,
- 4- *B. bifidum* 4101,
- 5- *B. longum* 4201,
- 6- *B. adolescentis* 4400,
- 7- *Laetobacillus acidophilus* R0052.

Було підтверджено, що з перевірених штамів мікроорганізмів найбільша β -галактозидазну активність проявив штам *S. Thermophilus* 2138.

3.2. Визначення бета-галактозидазної активності досліджуваних штамів та їх композицій

Було виявлено, що біфідобактерії мають низьку β -галактозидазну активність і це є однією з причин їх слабого розвитку в молоці. Виявлено, що активізація росту біфідобактерій в молоці шляхом введення ферменту β -

галактозидази, або за рахунок високої β -галактозидазної активності інших заквашуваних культур, пов'язана з досить низьким рівнем власної β -галактозидазної активності біфідобактерій. За таких умов біфідобактерії здобувають здатність вилучати з лактози необхідні для свого розвитку

глюкозу.



Діагр. 3.7. Рівень β -галактозидазної активності, A\хв

Як свідчать дані діаграми, штами *S. thermophilus* ct4 - 32,4 % і *S. thermophilus* 381 - 28,4 % показали найвищий рівень гідролізу лактози, дещо менший результат показала лактобацила - 21,8%. Водночас штами біфідобактерій - найнижчий *B. longum* 4201 - 12,1 %, *S. thermophilus* 2120 - 12,8%.

Враховуючи вище наведені дослідження, проведені спочатку з окремими видами молочнокислих бактерій, отало зрозуміло, що використання однієї культури для підвищення β -галактозидазної активності не є доцільним, навіть, якщо брати бактерії з досить високим рівнем β -галактозидазної активності відносно інших культур.

В зв'язку з цим доцільно культивувати біфідобактерії в молочному середовищі разом з термофільним стрептококсом, який відрізняється високою β -галактозидазною активністю.

За отриманими вище результатами, було сформовано дві комбінації молочно-кислих мікроорганізмів:

1- *S. thermophilus* (2138+2176+2120) у співвідношенні 1:1:1. Зроблена на основі високих показників утилізації лактози серед представників термофільних стрептококів, а також їх спорідненості, що дає перевагу у спільних умовах культивування. У досліді позначена, як

зразок номер 8.

2- *S. thermophilus* 2138 + *B. Bifidum* 4101, *B. Longum* 4201, *B. adolescentis* 4400 + *Lactobacillus acidophilus* R0052 у співвідношенні

5:3:2. Дана комбінація була побудована на основі найвищих

показників утилізації лактози серед різних представників молочно-кислих бактерій. В даній комбінації перевагою є склад, що максимально складається з представників людської мікрофлори, а

отже, буде краще засвоюватись при вживанні людиною готово

Рівень β -галактозидазної активності, А\хв



продукту. У досліді позначена, як зразок номер 9.

Діагр. 3.8. Рівень β -галактозидазної активності, А\хв

Результати досліджень свідчать про доцільність введення культур термофільного стрептококу з підвищеною β -галактозидазною активністю до складу заквашуваної композиції для стимуляції росту біфідобактерій у молоці при виробництві кисломолочних продуктів та біологічно активних добавок з пробіотичними властивостями.

Далі була складена загальна порівняльна діаграма (рис. 3.9).

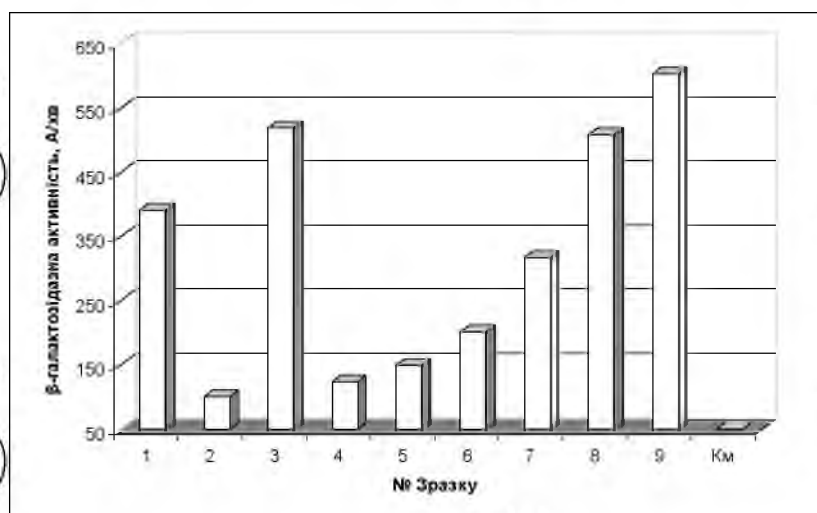


Рис. 3.2 β -галактозидазна активність досліджуваних штамів та їх композицій

1 - *S. thermophilus* 381; 2 - *S. thermophilus* 2120; 3 - *S. thermophilus* ct-4; 4 - *B. bifidum* 4101; 5 - *B. longum* 4201; 6 - *B. adolescentis* 4400; 7 - *Lactobacillus acidophilus* R0052; 8 - комбінація *S. thermophilus* 1:1:1; 9 - композиція БГЛ-Ф; 10 - Контроль (К)

Проведений кореляційний аналіз показав, що взаємозв'язку між рівнем утилізації лактози штамами, їх комбінацій та β -галактозидазною активністю утворених ними згустків існує і дорівнює 0,98, тобто ці параметри характеризуються прямо пропорційною залежністю.

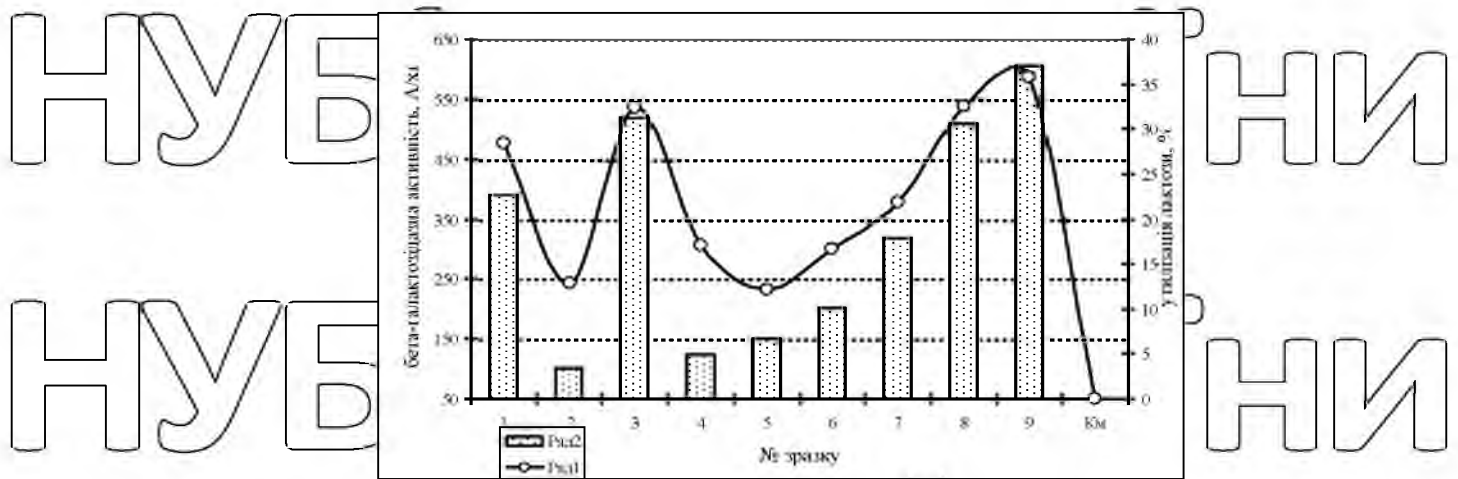


Рис. 3.10 Залежність β -галактозидазної активності та утилізація лактози

досліджуваних штамів та композицій 1- *S. thermophilus* 2106, 2- *S. thermophilus* 2120, 3- *S. thermophilus* 2138, 4- *B. bifidum* 4101, 5- *B. longum* 4201, 6- *B. adolescentis* 4400, 7- *Lactobacillus acidophilus* R0052, 8 Комбінація *S. thermophilus* (2138+2176+2120) 1:1:1, 9 – *S. thermophilus* 2138: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* : *Lactobacillus acidophilus* R0052, 10 - Км (самоквасне молоко).

Досліджено, як змінювалась концентрація лактози при заквашуванні молока різними культурами або їх комбінацією (табл. 3.11).

Високий рівень утилізації лактози спостерігали у комбінаціях мікроорганізмів порівняно з окремими штамми. Так, комбінація штамів *S. thermophilus* у співвідношенні 1:1:1 знижувала кількість лактози після ферментації до 32,5 %, а сухий бактеріальний препарат БТД-Ф – 35,8 %.

Отже, рівень споживання лактози є штам специфічною ознакою і у досліджених штамів та комбінацій варіює в межах від 12,8 % до 35,8 % від початкової її концентрації.

Аналіз β -галактозидазної активності взятих для дослідження штамів та їх комбінацій показав, що найменшою β -галактозидазною активністю володіли штами *B. longum* 4201, *B. adolescentis* 4400, *B. bifidum* 4100, що є однією з причин їх слабого розвитку в молоці, а найбільшою β -галактозидазною активністю – *S. thermophilus* 2138 (519 А/хв).

Таблиця 3.11

Утилізації лактози промисловими штамами та їх комбінацій

№ п/п	Назва культур	Утилізація лактози, %
1	<i>S. thermophilus</i> 2176	28,4
2	<i>S. thermophilus</i> 2120	12,8
3	<i>S. thermophilus</i> 2138	32,4
4	<i>B. bifidum</i> 4101	17,1
5	<i>B. longum</i> 4201	12,1
6	<i>B. adolescentis</i> 4400	16,7
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> R0052	21,8
8	Комбінація <i>S. thermophilus</i> 1:1:1	32,5
9	БТЛ-Ф*	35,8
10	Контроль (К)*	15,8

*БТЛ-Ф-композиція (ББ + термофільні стрептококи + ЛБ)

**Контроль (К) - кисле молоко.

Штам *Lactobacillus acidophilus* R0052 мав середнє значення β -галактозидазної активності при дослідженні його у чистій культурі, що входить до композиції. Композиція всіх штамів у співвідношенні 3%+5%+2% (молочнокислі стрептококи + біфідобактерії + лактобацили) показала найкращий результат щодо накопичення β -галактозидази - 604 А/хв.

З серії проведених дослідів ми можемо зробити висновок, що пгами термофільних стрептококів *S. thermophilus* 2176 та *S. thermophilus* 2138 при їх розвитку в молоці призводять до найбільшого зниження лактози, це свідчить

про їх вищу здатність до продукування β -галактозидази серед лактококів у порівнянні з іншими штамами. Найбільшу β -галактозидазну активність проявляє симбіоз мікроорганізмів термофільного стрептококу, біфідобактерій та лактобацил у співвідношенні 3 % + 5 % + 2 %.

Як видно з рисунку окремі штами *S. thermophilus* мають нижчі показники β -галактозидазної активності порівняно з їх комбінаціями, що свідчить про виникнення синергізму їх β -галактозидазних властивостей.

Проведений кореляційний аналіз показав, що взаємозв'язок між рівнем утилізації лактози штамами, їх комбінацій та β -галактозидазною активністю існує та дорівнює $r = 0,98$.

Результати досліджень свідчать про доцільність залучення культур термофільного стрептокока з високою β -галактозидазною активністю до складу заквашуваної композиції для стимуляції росту біфідобактерій в молоці при виробництві кисломолочних продуктів та біологічно активних добавок з пробіотичними властивостями.

3.3. Одержання нової бактеріальної закваски

Етапи отримання нової бактеріальної закваски для кисломолочних продуктів, передбачають приготування живильного середовища, приготування посівного матеріалу для представників людської мікрофлори - біфідобактерій, термофільних молочнокислих і стрептококових бактерій, накопичення біомаси в живильному середовищі на основі молока.

Для проведення роботи були обрані *Bifidobacterium bifidum* IMB B-7032, *Bifidobacterium longum* IMB B-7033, *Bifidobacterium longum* IMB B-7033, *Bifidobacterium adolescentis* IMB B-7035, у співвідношенні 1 до 1 ssp. *thermophilus* IMB B-7179, VKPM B-7773, B-7774 у співвідношенні 1: 1: 1 та бактерії *Lactobacillus acidophilus* R0052, при співвідношенні між видами мікрофлори 5:3:2, здійснювали накопичення біомаси - спільне культивування біфідобактерій і лактобактерій при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом (7 ± 1)

години, потім термостатні молочнокислі бактерії і культивують ще (7 ± 1) години. Відмінною особливістю запропонованого у роботі способу є

використання в ферментаційній композиції трьох різних типів мікроорганізмів, що входять до складу нормальної мікрофлори кишечника людини, а саме типів мікрофлори: біфідобактерій, термофільних молочнокислих та лактобацил.

Для проведення комбінування було відібрано три штами біфідобактерій: *B. bifidum* IMB B-7032, *B. longum* IMB B-7033, *B. adolescentis*

IMB B-7035 (скорочена назва *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*: 1: 1: 1; три штами термофільних молочнокислих бактерій *S. salivarius* ssp. *thermophilus* IMB B-7179, ВКІМ B-7773, B-7774 (скорочена назва *S. thermophilus*) у

співвідношенні 1: 1: 1; один штама бактерій *Lactobacillus acidophilus* R0052, із співвідношенням між видами мікрофлори 5: 3: 2, проведено окреме сумісне вирощування – накопичення біомаси.

Етапи отримання нової бактеріальної закваски для виробництва кисломолочних продуктів передбачає:



Рис. 3.11. Етапи отримання нової бактеріальної закваски

Приготування посіву трьох штамів біфідобактерій проводили на гідролізованому молочному середовищі протягом (16 ± 1) год при

температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в анаеробних умовах. Приготування посіву трьох

штамів термофільних молочнокислих бактерій проводили у знежиреному

молоці при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом (8 ± 1) год. Приготування

посівного матеріалу штаму лактобацилюсь у лактатному рідкому середовищі

при $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом (24 ± 1) год.

Спільне культивування, накопичення мікрофлори біфідобактерій і

лактобацил у живильному середовищі проводили протягом (7 ± 1) год без

перемішування при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, потім додавали термофільні

молочнокислі бактерії та стерильні розчини глюкози і аскорбінової кислоти -

1 і 0,05% відповідно. Подальше культивування проводилось при температурі

$(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на протязі 7 год, в анаеробних умовах.

Приготували живильне середовище. Рецептūra живильного

середовища: У 1 дм водопровідної води розчинили 30,0 г сухого знежиреного

молока, встановили рН 6,8, суміш нагрівали до $55 ^\circ\text{C}$, вносили 0,3 г

протосубтиліну з активністю 70 од. і інкубували в цих умовах протягом 2,5

годин. Після нагріву додавали: 5 г гідролізату лактози, 5 г тризаміщеного

цитрату натрію, 5 г натрію оцтової кислоти, 2 г екстракту дріжджів, 0,5 г 7-

водного сульфату магнію, 0,05 г 4-водного сульфату марганцю, 0,1 г сірчаної

кислоти, 0,1 г -водного заліза (III), 0,02 дм³ кукурудзяного екстракту. У

середовищі додаванням 40% розчину гідроксиду натрію встановили рН 7,8 і

стерилізували при $121 ^\circ\text{C}$ протягом 30 хв, активна кислотність середовища

після стерилізації становила 6,8 од. рН, охолодили до температури $55 ^\circ\text{C}$.

Приготували окремі розчини: глюкози — 20 г розчинили у 100 см

дистильованої води, аскорбінову кислоту — 0,5 г —розчинили у 50 см³

дистильованої води, стерилізували при $(112 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом 15 хв.

У підготовлене середовище додавали 1% стерильного знежиреного

молока. Приготування посівного матеріалу трьох штамів *B. bifidum*, *B.*

НУБІП УКРАЇНИ

longum, *B. adolescentis* у співвідношенні 1: 1: 1 проводили у гідролізатно-молочному середовищі протягом (16 ± 1) год при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в анаеробних умовах. Приготування посівного матеріалу трьох штамів *St. thermophilus* у співвідношенні 1:1:1 проводили в знежиреному молоці при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом (8 ± 1) год.

НУБІП УКРАЇНИ

Приготування посіву штаму *Lactobacillus acidophilus* в лактатному рідкому середовищі проводили при $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом (24 ± 1) год. У живильне середовище додавали 5% біфідобактерій і 2% лактобацил. Витримували, не перемішуючи, при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом (7 ± 1) години, потім вносили 3% термофільних молочнокислих бактерій і проводили спільне культивування при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ще (7 ± 1) год. Протягом 8-9 годин запроваджували додаткове збагачення живильного середовища розчином 5 г глюкози.

НУБІП УКРАЇНИ

Після накопичення біомасу відокремили від культуральної рідини і змішали із захисним середовищем у співвідношенні 1:2 або 1:3, утворюючи суспензію. Стерильне захисне середовище містить 15% сахарози, 3-4% желатину і 10% сухого знежиреного молока. Суспензію піддавали заморожуванню і висушували у сублимаційній сушарці при температурі від $(-40) ^\circ\text{C}$ до $(+30) ^\circ\text{C}$. Масова частка вологи в отриманій сухій заквасці становила не більше 5%.

НУБІП УКРАЇНИ

Використання такого підходу дозволило протягом (14 ± 1) год. культивування отримати з 1 дм³ культуральної рідини 15,8 г сухого препарату – бактеріальної закваски. Суху біомасу подрібнили, розфасували у стерильну тару та закупорили. Визначений термін придатності бактеріального препарату, становить 6 місяців при температурі $(-4 \pm 2) ^\circ\text{C}$, а 12 місяців при $(-18 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

НУБІП УКРАЇНИ

ВИСНОВКИ

1. Отже, активність β -галактозидази є одним із критеріїв відбору штаму до складу бактеріальних препаратів для кисломолочних продуктів спеціального призначення. Більш споріднені людському організму *Bifidobacterium* мають низькі показники гідролізу лактози, тому було досліджено консорціум бактерій. Для підвищення активності біфідобактерії культивували разом з штамом мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus*, який має достатньо високу бета-галактозидазну активність і може використовуватись в подальшому впровадженні в харчовій промисловості у

виробництві різних заквасок, йогуртів, кефірів та інших молочнокислих продуктів.

2. За усіма показниками, найкращою стала комбінація культур *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* і *Lactobacillus acidophilus* (у співвідношенні 3:5:2), що мають показник утилізації лактози 35,8%.

3. Аналіз β -галактозидазної активності взятих для дослідження штамів та їх комбінацій показав, що найменшою β -галактозидазною активністю володіли штами *B. longum* 4201, *B. adolescentis* 4400, *B. bifidum* 4100, що є однією з причин їх слабого розвитку в молоці, а найбільшою β -галактозидазною активністю – *S. thermophilus* 2138 (519 А/хв). Штам *Lactobacillus acidophilus* R0052 мав середнє значення β -галактозидазної активності при дослідженні його у чистій культурі, що входить до композиції.

4. Композиція всіх штамів у співвідношенні 3%+5%+2% (молочнокислі стрептококи + біфідобактерії + лактобацили) показала найкращий результат щодо накопичення β -галактозидази – 604 А/хв. Культивування протягом (14 ± 1) год. Отриманої суміші бактерій та подальші технологічні операції дозволили отримати з 1 дм³ культуральної рідини 15,8 г сухого препарату – бактеріальної закваски.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. β - галактозидазна активність бактерій, як критерій відбору штамів до складу бактеріальних препаратів / Потемська О. І., Кігель Н. Ф., Даниленко С. Г. // Food Science and Technology, 2017
2. Babayan, M. L. Lactase deficiency: latest diagnostic methods and treatment. Meditsinskiy Sovet. 2013 Jan; 1: p. 24-27
3. Marushko Yu. V., Grachova M. G., Iovlitsa T. V. Actual questions of diagnostics and therapy of secondary lactase deficiency in children. Sovremennaya pediatriya. 2014 Aug; 8(64): p. 110-114.
4. Sahi T, Launiala K, Laitinen H. Hypolactasia in a fixed cohort of young Finnish adults. A follow-up studies. Scand J Gastroenterol. 2009, p. 65-70
5. Savaiano D. A, Byers D. A. The myth of increased lactose intolerance in African Americans. J Am Coll Nutr. 2005, p. 69-73
6. Tishkoff S. A, Reed F. A, Ranciaro A. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. Nat Genet. 2007, p. 31-40
7. Оптимізація діагностики та лікування хронічної діареї, обумовленою лактазною недостатністю у дітей раннього віку / Радушинська Т. Ю / дис. на зд. наук. ступеня кандидата медичних наук за спец. 14.01.10 – педіатрія, Державний заклад «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ, 2018, с. 158
8. Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG. Absence of the lactase persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. Proc Natl Acad Sci USA. 2007, p. 36-41.
9. Heyman M.B. Lactose intolerance in infants, children and adolescents. Pediatrics, 2006, p. 79-86.
- 10 Itan Y, Jones BL, Ingram CJ, Swallow DM, Thomas MG. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. BMC Evol Biol. 2010, p. 36-40.

11. Zhao L, Fox M, Cong Y. Lactose intolerance in patients with chronic functional diarrhoea: the role of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010, p. 892–900.

12. Tomba C, Baldassarri A, Coletta M. Is the subjective perception of lactose intolerance influenced by the psychological profile? *Aliment Pharmacol Ther.* 2012, p. 660–669.

13. Uchida N, Sakamoto O, Irie M. Two novel mutations in the lactase gene in a Japanese infant with congenital lactase deficiency, 2012, p. 69-72.

14. Terrin G, Tomaiuolo R, Passariello A, Elce A, Amato F, Di Costanzo M. Congenital diarrheal disorders: an updated diagnostic approach. *Int J Mol Sci.* 2012, p. 63–85.

15. Шадрін О. І., Хомутовська К. О. Проблеми діагностики лактазної недостатності у дітей раннього віку. *Дитячий лікар.* 2014, с. 5-9

16. Gladstone B, P. Ramani S, Mukhopadhyaya I, Muliyl J, Sarkar R, Rehman A. M, et al. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. *N Engl J Med.* 2011, p. 37-46.

17. Sederdahl B. K., Yi J, Jerris R. C., Gillespie S. E., Westblade L. F., Kraft C. S., Shane A. L., Anderson E. J. Trends in rotavirus from 2001 to 2015 in two paediatric hospitals in Atlanta, Georgia. *Epidemiol Infect.* 2018, p. 465-467.

18. Giannattasio A, Guarino A, Lo Vecchio A. Management of children with prolonged diarrhea. *FT000Res.* 2016, p. 35-42.

19. Bevins C. L., Salzman N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011, p. 56-68.

20. Бета-галактозидаза [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D1%82%D0%B0-%D0%B3%D0%B0%D0%BB%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D0%B7%D0%B8%D0%B4%D0%B0%D0%B7%D0%B0>

21. Juers, Douglas H.; Hakda, Shamina; Matthews, Brian W.; Huber, Reuben E. (2003-11-01)

22. Matthews B. W. (June 2005). «The structure of *E. coli* beta-galactosidase». *C. R. Biol.* 328 (6): 549–56.

23. Beta-Galactosidase Assay (A better Miller) [Електронний ресурс]. Режим доступу:

[https://openwetware.org/wiki/Beta-](https://openwetware.org/wiki/Beta-Galactosidase_Assay_(A_better_Miller))

[Galactosidase Assay \(A better Miller\)](https://openwetware.org/wiki/Beta-Galactosidase_Assay_(A_better_Miller))

24. Nifia AJ, Ballou GP (2009). Фундаментальні лабораторні підходи до біохімії та бістехнології.

25. Камель З, Мохамед Н.М., Фарахат М.С. (2016). "Оптимізація умов культури для одержання В-галактозидази *Bacillus Megaterium* NM56,

виділеної з сирого молока" (PDF). Науковий журнал фармацевтичних, біологічних та хімічних наук. 7(1): 366–376.

26. Добсон, Уоррен, ПANNELL, Форстер, (березень 2000). "Туморогенез у мишей із злиттям онкогенного лейкозу M11 та бактеріального гена *lacZ*". Журнал EMBO, с. 43–51.

27. Lee BY, Han JA, Im JS, Morgone A, Johnson K, Goodwin EC та ін. (Квітень 2006) "Бета-галактозидаза, асоційована зі старінням, - це лізосомальна бета-галактозидаза". Старіння клітини. с. 87–95.

28. Juers DH, Nakda S, Matthews BW, Huber RE, 2003. "Структурна основа для зміненої активності Gly794 варіантів бета-галактозидази кишкової палички" *Біохімія*. 42 (46): с. 13505–13011.

29. Salehi S, Eckley L, Sawyer G. J., Zhang X, Dong X, Freund J. N., Fabre J. W., 2009. "Кишкова лактаза як аутологічний репортерний ген бета-галактозидази для досліджень експресії генів *in vivo*". Генна терапія людини. 20 (1): с. 21–30.

30. Ishikawa K, Kataoka M, Yamamoto T, Nakabayashi M, Watanabe M, Ishihara S, Yamaguchi S (липень 2015). "Кристалічна структура β-галактозидази з *Bacillus circulans* ATCC 31382 (BgaD) та конструкція термофільних мутантів". Журнал FEBS. 282 (13): с. 2540–2552.

31. Бета-галактозидаза - Beta-galactosidase. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.wikiqube.net/wiki/Beta-galactosidase>

32. Jiers DH, Matthews BW, Huber RE (грудень 2012 р.). "LacZ β -галактозидаза: будова та функції ферменту, що має історичне та молекулярно-біологічне значення". Білкова наука. 21 (12): 1792-1807.

33. Гері Р.К., Кінделл С.М. (серпень 2005 р.). "Кількісний аналіз активності бета-галактозидази, пов'язаної зі старінням, у екстрактах клітин ссавців". Аналітична біохімія. 343 (2): 329-334.

34. Бельмер, С. В. Современный взгляд на непереносимость лактозы [Текст] / С. В. Бельмер // Педиатрия (Прил. к журн. Consilium Medicum). – 2012. – № 4. – С. 7–10.

35. Абагуров, А.Е. Лактазная недостаточность у детей [Текст] / А.Е. Абагуров, А.А. Никулина, Л.Л. Петренко // Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии. – 2015. – 7, №2. – С. 51-63

36. Shaukat, A. Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. [Text] / A. Shaukat, M.D. Levitt, B. C. Taylor // Ann Intern Med. – 2010. – №12, (152). – P. 797-803.

37. Лактазная недостаточность у больных с постинфекционным синдромом раздраженного кишечника и роль микрофлоры кишечника в ее развитии (результаты рандомизированного двойного слепого контролируемого исследования) [Текст] / П. Д. Шербаков, А. И. Парфенов, И. Н Ручкина и др. // Экспериментальная и клиническая Гастроэнтерология – 2012. – № 5. – С. 91-98.

38. Сравнительная оценка эффективности различных схем профилактического приема мультипробиотика «СИМБИТЕР» в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании у детей [Текст] / О. В. Выговская, В.В. Бережной, Р.А. Моисеенко и др. // Современная педиатрия. – 2011. – 35, № 1. – С. 111-116.

39. Ганина, В.И. β -галактозидазная активность молочнокислых бактерий и бифидобактерий [Текст] / Ганина В.И., Калинина Л.В., Большакова Е.В. // Молочная промышленность. – 2002. – № 8. – С. 36-37.

40. Bouzar, F. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production [Text] / F. Bouzar, J. Cernung, M. Desmazeaud // Journal of dairy science. – 1997. – 80, №10. – P. 2310-2317.

41. Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles [Text] / F. Vin, P. Rådström, D. Herman, L. Vuyst // Applied and environmental microbiology. – 2005. – 71, № 7. – P. 3659-3667.

42. Zisu, B. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275 [Text] / B. Zisu, N. P. Shah // Journal of dairy science. – 2003. – 86, № 11. – P. 3405-3415.

43. Intra- and extracellular β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. [Text] / P.L. Møller, F. Jørgensen, Q.C. Hansen et al // Appl. Environ Microbiol. – 2001. – 67, № 5. – P. 2276-2283.

44. Лацидофіл (Lacidofil). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/265981/>

45. Симбітер ацидофільний пакет. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://isa.com.ua/simbiter-acidofil-nyt-bak-10-0-mes-do-3-h-let.html>

46. Біфіформ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[2589\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[2589])

47. Машкін М. І., Парш Н. М. Технологія молока і молочної продукції. Навчальне видання. – К.: Вища освіта, 2006. – 351 с. іл.

48. Pedram, N., Ataei, S.A. Optimization of a Modified GS Medium for a Probiotic Strain (*L. acidophilus* ATCC4356) // APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY, 2014, №(1): 25-29.

49. Потемська О.І., Кігель Н.Ф., Даниленко С.Г., Копилова К.В. β -галактозидазна активність бактерій як критерій відбору штамів до

складу бактеріальних препаратів. Харчова наука і технологія. 2017. 11(3). Р. 35-40.

50. Дымарь О. В., Емельянова Л.Н., Джумок Г.С. Определение оптимальных параметров процесса ферментативного гидролиза

лактозы в молочной сыворотке. Пищевая промышленность: наука и технологии. 2012. 1 (15). С.24-30.

51. Jiang T., Savaiano D. (1997). In vitro lactose fermentation by human colonic bacteria is modified by *Lactobacillus acidophilus* supplementation. J. Nutr. 127 (8). P. 1489-1495.

52. Garman J., Coolbear T., Simart J. (1996). The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalyzed by beta-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnology. 46(1). P. 22-27.

53. Данильчук Т., Ганина В., Головин М. (2013). Низколактозные молочные продукты. Пути получения. [Молочные продукты с низким содержанием лактозы. Способы получения. Молочная промышленность. [Молочная промышленность]. 2013. 11. С.41-42.

54. Рябая Н., Головнева Н., Самарцев А. (2015). Селекция бифидобактерий по устойчивости к кислотному стрессу. Микробные биотехнологии: Фундаментальные и прикладные аспекты: сборник научных статей. Белорусская наука. С. 57-68.

55. Біотехнологічні аспекти застосування штамів з β-галактозидазною активністю у виробництві ферментованих молочних продуктів / Мінорова А. В., Даниленко С. Г. // ПРОДОВОЛЬЧІ РЕСУРСИ Т. 9 (2021), № 16, с. 118-134.

56. Nekrasov P., Tkachenko N. (2014). Innovative technology of combined bifidus containing fermented milk drinks of functional purpose. Food science and technology. 2(27). P.49-56.

57. Дідух Н. (2008). Наукові основи розробки технологій молочних продуктів функціонального призначення. Наукові основи розробки

технологій молочних продуктів функціонального призначення. Дисертація на здобутті наукового ступеня доктора технічних наук за спеціальністю 18.05.16 – технологія продуктів харчування. Одеська національна академія харчових технологій МОН України, Одеса.

58. Петров А., Матвеев А., Стрижко М. (2013). Исследование штаммов микроорганизмов, обладающих бета-галактозидазной активностью и их анализ. С. 16-20.

59. Дымар О., Соколовская Л., Райский А. (2013). Комбинация ферментативного гидролиза лактозы и электродиализа - основа производства сгущенных и сухих молочных продуктов нового поколения. I. С. 55-64.

60. Букуру Л. К., Скворцов Е. В., Багаева Т. В., Канарская З. А. Эффективность применения б – галактозидазы для получения низколактозного напитка на основе молочной сыворотки. 2017. 20 (13). С.117-119.

61. Патент № 107656 Україна U МПК (2016 01) Спосіб одержання бактеріальної закваски "Біфідолакт", дата подання заявки: 26.06.2015, опубл. 24.06.2016 Бюл. № 12, власник: Інститут продовольчих ресурсів НААН.

62. *Bifidobacterium bifidum*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://laktiale.ua/pro-laktiale/bifidobacterium-bifidum/>

63. *Bifidobacterium bifidum* - физиолого - биохимические признаки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bio-x.ru/articles/bifidobacterium-bifidum-fiziologo-biokhimicheskie-priznaki>