

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ



КАПУСТЯН АНТОНІНА ІВАНІВНА

УДК 613.292:[57-034:54-386]:664-023.871

**НАУКОВІ ОСНОВИ РОЗРОБКИ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ
ІМУНОТРОПНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ ТА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ
НА ОСНОВІ СПОЛУК БАКТЕРІАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора технічних наук

ОДЕСА – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Роботу виконано в Одеській національній академії харчових технологій Міністерства освіти і науки України.

Науковий

консультант:

- доктор технічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України
Черно Наталія Кирилівна,
Одеська національна академія харчових технологій,
професор кафедри харчової хімії та експертизи

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, професор,
Юкало Володимир Глібович,
професор кафедри харчової біотехнології і хімії,
Тернопільський державний технічний університет
ім. І. Пулюя;
- доктор технічних наук, старший науковий
співробітник,
Науменко Оксана Василівна,
завідувачка відділом технологій хліба
та біотрансформації зернових продуктів,
Інститут продовольчих ресурсів НААН України;
- доктор технічних наук, професор,
Сімахіна Галина Олександрівна,
завідувачка кафедрою технології оздоровчих
продуктів,
Національний університет харчових технологій.

Захист відбудеться *23 квітня 2021 р. о 10.00* на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.01 в Одеській національній академії харчових технологій за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112 в ауд. А-234.

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської національної академії харчових технологій за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112.

Автореферат розіслано *19 березня 2021 р.*

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
к.т.н., доцент



Тетяна НІКІТЧІНА

Підписано до друку 22.02.2021 р. Формат 60х84/16.
Папір офсетний. Цифровий друк. Ум. друк. арк. 2,33.
Тираж 100 прим. Зам. № 55/0321.

Видавництво та друк: ОЛДІ-ПЛЮС
вул. Паровозна, 46а, м. Херсон, 73034
Свідоцтво ДК No 6532 від 13.12.2018 р.

Тел.: +38 (0552) 399-580, +38 (098) 559-45-45,
+38 (095) 559-45-45, +38 (093) 559-45-45
Для листування: а/с 20, м. Херсон, Україна, 73021
E-mail: office@oldiplus.ua

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Загально визнаною проблемою сучасного суспільства є зниження його імунного статусу. Людина з діагнозом «понижений імунітет» найбільш вразлива до застудних, інфекційних захворювань та інших супутніх хвороб. Головні важелі впливу, направлені на подолання цієї проблеми – розроблення та впровадження превентивних заходів. По-перше, це перегляд харчової густини раціону у відношенні його біологічної цінності, по-друге, введення в раціони харчування імунотропних функціональних інгредієнтів направленої дії. Слідуючи концепції Загальнодержавної програми «Здоров'я 2020: український вимір», рекомендаціям Всесвітньої організації охорони здоров'я та світовим трендам, розроблення дієтичних добавок та функціональних харчових продуктів з вмістом імунокоригувальних харчових інгредієнтів для нутритивної підтримки населення зі зниженим імунним статусом є вельми актуальним.

Над проблемою розроблення функціональних продуктів харчування працюють вчені Одеської національної академії харчових технологій, Національного університету харчових технологій, Харківського державного університету харчування та торгівлі, Київського національного торговельно-економічного університету, Інституту геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України, Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України а також учені ряду закордонних науково-освітніх установ. Усе більшого поширення набувають дослідження, присвячені створенню функціональних продуктів харчування з використанням інгредієнтів, що володіють направленою фізіологічною активністю, але разом з тим, мало уваги приділено таргетним інгредієнтам імунотропної дії.

Перспективним у даному відношенні є використання сполук постбіотичного походження, а саме, муропептидів, які є об'єктами для розпізнавання рецепторами імунної системи. Муропептиди – структурні одиниці пептидоглікану клітинних стінок бактерій, володіють усіма необхідними для патоген-асоційованих молекулярних структур властивостями, що виражаються в стимуляції імунітету і здатності формувати захист від мікробних інфекційних агентів. Екзогенне введення муропептидів відтворює фізіологічні та еволюційно закріплені механізми імунної відповіді.

Існує ряд фармакологічних ін'єкційних та назальних препаратів постбіотичного походження з вмістом муропептидів, але з огляду на те, що низькомолекулярні муропептиди можуть долати кишечний бар'єр, вони є перспективними імунокоригувальними компонентами пероральних форм дієтичних добавок та функціональних харчових інгредієнтів для нутритивної підтримки населення, що страждає на розлади імунної системи. Використання нативних мікробних клітин в якості функціональних імунотропних інгредієнтів є малоефективним, адже сигналами для запуску імунної відповіді є їхні фрагменти. У зв'язку з цим, доцільною є спрямована часткова деструкція бактерій з метою отримання біологічно активних речовин, здатних легше засвоюватися і вступати

в біохімічні процеси, прискорюючи очікуваний імунотропний ефект. На сьогодні відсутній системний аналіз щодо направленої біотрансформації бактеріальних пептидогліканів задля використання продуктів їхньої деградації для функціонального харчування.

Важливою ланкою імунного генезу є також достатнє та збалансоване надходження біоелементів до макроорганізму. Брак біоелементів запускає механізми хронізації соматичних захворювань, пригнічує здатність до специфічної імунологічної реакції на інфекційні агенти. Дисбаланс біоелементів служить відправною точкою, або сприяє розвитку патології імунної системи. Актуальною є постановка питання щодо наноконструювання хелатних структур біометалів з імунотропними субстанціями мікробного походження, які виконують роль біолігандів.

Аналіз тематичної наукової літератури дозволив сформулювати **наукову гіпотезу** роботи: для подолання проблеми порушення функції імунної системи людини шляхом корекції харчового статусу, перспективним є застосування у раціонах населення дієтичних добавок, харчових інгредієнтів і продуктів з вмістом імунотропних компонентів мікробіального походження, які є об'єктами для розпізнавання рецепторами імунної системи, та наноконструйованих на їхній основі хелатних структур есенціальних біометалів.

Мета роботи – наукове обґрунтування та розроблення технологій імунотропних дієтичних добавок, функціональних інгредієнтів та продуктів харчування на основі сполук бактеріального походження.

Для досягнення поставленої мети необхідно здійснити наступні **завдання дослідження**:

- обґрунтувати перспективу використання сполук постбіотичного походження, а саме муропептидів, у якості імунотропних компонентів дієтичних добавок та харчових інгредієнтів;
- здійснити скринінг бактеріальної сировини як субстрату для отримання імунотропних субстанцій;
- розробити методологічні підходи щодо деструкції пептидогліканів бактеріальних клітин з метою отримання імунотропних сполук;
- здійснити ідентифікацію та надати характеристику фрагментів клітинних стінок бактерій: вивчити хімічний склад дезінтегратів, визначити молекулярно-масовий розподіл продуктів деградації клітинних стінок бактерій;
- розробити методологічні підходи щодо отримання органічних комплексів біометалів із біолігандами бактеріального походження;
- розробити технології імунотропних дієтичних добавок, харчових інгредієнтів та функціональних продуктів харчування;
- довести біологічну активність розроблених функціональних харчових інгредієнтів *in vivo*, визначити їхню токсичність та ефективну дозу;
- запропонувати класифікацію функціональних харчових інгредієнтів за напрямом їхньої фізіологічної дії;

- обґрунтувати технології харчових продуктів з вмістом розроблених функціональних харчових інгредієнтів, надати рекомендації щодо особливостей їхнього внесення у певні харчові системи;
- розробити нормативну документацію на нові види продуктів функціонального призначення, здійснити промислову апробацію, дати оцінку їхньої економічної ефективності.

Об'єкт досліджень – технологія імунотропних дієтичних добавок та функціональних харчових інгредієнтів постбіотичного походження.

Предмет досліджень – методологічні підходи щодо отримання муропептидів, режими фізичних та ензиматичних методів деструкції пептидогліканів пробіотичних бактерій, параметри отримання хелатних структур есенціальних біометалів зі змішанолігандними системами постбіотичного походження, фізіологічна активність отриманих інгредієнтів.

Методи досліджень – аналітичні, фізико-хімічні, спектроскопічні, біохімічні, мікробіологічні, сенсорні, фізіологічні, токсикологічні, імунологічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів.

Уперше:

- запропоновано використання низькомолекулярних продуктів деградації пептидогліканів пробіотичних бактеріальних культур як патогенасоційованих молекулярних структур у якості компонентів харчових інгредієнтів та дієтичних добавок для нутритивної підтримки населення зі зниженим імунним статусом;
- запропоновано отримання біодоступних форм есенціальних біометалів шляхом їхнього комплексоутворення з продуктами метаболізму та переробки пробіотичних культур;
- розроблено метод детекції муропептидів у складі бактеріальних дезінтегратів;
- розроблено метод визначення комплексоутворювальної ємності змішанолігандних органічних систем по відношенню до йонів металів;
- обґрунтовано методологічні підходи до деструкції пептидогліканів пробіотичної бактеріальної сировини з метою отримання імунотропних муропептидів, що передбачають використання ендогенного ензимного потенціалу, екзогенних ферментних композицій із широким ареалом субстратної специфічності, залучення комбінованих методів ізоляції із застосуванням фізичних факторів впливу;
- обґрунтовано наукові основи наноконструювання органічних комплексів біометалів, в яких низькомолекулярні продукти деструкції бактеріальних пептидогліканів та продукти метаболізму виконують роль змішанолігандних систем;
- обґрунтовано наукові основи виробництва імунокоригувальних харчових інгредієнтів та дієтичних добавок на основі низькомолекулярних продуктів деструкції бактеріальних пептидогліканів та органічних форм біометалів, розроблено технологічні режими їхнього отримання та нормативну документацію для впровадження у виробництво, надано рекомендації щодо

дозування розроблених харчових інгредієнтів у певні категорії харчових продуктів.

Удосконалено:

- класифікацію функціональних інгредієнтів за фізіологічною спрямованістю;
- класифікацію методів дезінтеграції бактеріальних клітин;
- технології виробництва пшеничного хліба та апельсинового напою.

Практична значимість. Розроблено технології імунокоригувальних харчових інгредієнтів «Імунокорект*інгредієнт» та «Вітапостум^{Fe}*інгредієнт» для харчових систем з $a_w = 0,8-1$ та $a_w = 0,3-7$, дієтичних добавок «Імунокорект» та «Вітапостум^{Fe}» на основі низькомолекулярних продуктів деструкції бактеріальних пептидогліканів та органічних форм біометалів. Науково обгрунтовано послідовність технологічних операцій, режими виробництва дієтичних добавок та функціональних харчових інгредієнтів. Розроблено та затверджено нормативну документацію для впровадження у виробництво. Проведено промислову апробацію розроблених технологій на науково-виробничому біотехнологічному підприємстві «Аріадна», м. Одеса. Надано рекомендації щодо специфіки введення та дозування розроблених харчових інгредієнтів.

Новизну технологічних рішень підтверджено патентом України на винахід №122754 «Дієтична добавка "Імунокорект"», патентами України на корисну модель № 100637 «Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок бактерій», № 138938 «Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок пробіотичних бактерій», № 141840 «Дієтична добавка "Імунокорект"».

Розроблені у роботі методики визначення муропептидів у складі бактеріальних гідролізатів (Патент України на корисну модель № 142457) та визначення комплексоутворювальної ємності змішанолігандних органічних систем відносно іонів металів (Патент України на корисну модель № 138829) придатні для використання у наукових, випробувальних та промислових лабораторіях, у навчальному процесі при виконанні магістерських робіт, у лабораторних практикумах курсів «Експертиза харчових продуктів», «Харчова хімія».

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконувались у рамках тематик проблемної науково-дослідної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій: «Рослинні і мікробні полісахариди як об'єкти біомодифікації» (номер державної реєстрації: 0112U000108); «Науково-технічні основи біотехнологій функціональних інгредієнтів та продуктів на основі полісахаридів» (номер державної реєстрації: 0115u000290); «Біотрансформація рослинної і мікробної сировини як метод отримання фізіологічно-функціональних харчових інгредієнтів і дієтичних добавок» (Номер державної реєстрації: 0117U000362), а також держбюджетної наукової роботи кафедри харчової хімії та експертизи ОНАХТ.

Особистий внесок здобувача полягає в аналізі стану проблеми, формулюванні наукової гіпотези, її теоретичному та експериментальному

підтвердженні, розробці та реалізації програми дослідження, аналізі та узагальненні результатів теоретичних та експериментальних досліджень, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до публікації, складанні заявок на об'єкти інтелектуальної власності, розробці нормативної та технологічної документації, впровадженні науково-технічних розробок у виробництво та освітній процес.

У матеріалах, опублікованих у співавторстві, дисертанту належать основні ідеї, наукове обґрунтування теоретичних положень, загальне керівництво та безпосереднє проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення одержаних результатів, формулювання висновків.

Апробація результатів дисертаційного дослідження. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися та одержали позитивну оцінку науковців і фахівців галузі на всеукраїнських, міжнародних та зарубіжних конференціях: Сучасний ринок товарів та проблеми здорового харчування (Харків, 2013 р.); Харчові добавки. Харчування здорової і хворої людини (Донецьк, 2013); Lékařství. Biologické vědy (Praha, 2014); Микроэлементы в медицине, ветеринари, питания: перспективы сотрудничества и развития (Одесса); Інноваційні технології розвитку у сфері харчових виробництв, готельно-ресторанного бізнесу, економіки та підприємництва: наукові пошуки молоді (Харків, 2014 р.); Проблеми формування здорового способу життя у молоді (Одеса, 2014 р.); Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека (Київ, 2015 р., 2016 р., 2018 р., 2020 р.); Наукова конференція викладачів Одеської національної академії харчових технологій (Одеса, 2015 р., 2016 р., 2017 р., 2018 р., 2019 р.); Стан і перспективи харчової науки та промисловості (Тернопіль, 2015 р.); Розвиток харчових виробництв, ресторанного та готельного господарств і торгівлі: проблеми, перспективи, ефективність (Харків, 2016 р., 2017 р., 2018 р.); Харчові технології, хлібопродукти і комбікорми (Одеса, 2016 р., 2017 р., 2018 р., 2019 р.); Харчова наука, техніка та технології – 2017 (Пловдив, 2017); Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції (Київ, 2019 р.); The 7th International scientific and practical conference “Perspectives of world science and education” (Osaka, Japan, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 55 наукових праць, у тому числі: 22 статті, з них 19 статей у наукових фахових виданнях України, 2 статті у періодичних виданнях інших держав, які відповідають науковому напрямку дисертаційної роботи, 20 статей у наукових виданнях, що цитуються у міжнародних наукометричних базах (у тому числі 7 у Scopus Web of Science); 1 патент на винахід, 5 патентів України на корисну модель; 1 монографія, 25 тез доповідей та матеріалів конференцій, у тому числі 3 у далекому зарубіжжі.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, шести розділів, висновків, списку літератури і додатків (Том 2). Основний зміст роботи викладено на 272 сторінках, включаючи 57 таблиць, 60 рисунків. Список використаних бібліографічних джерел містить 453 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність обраного напрямку дисертаційної роботи, викладено наукову гіпотезу, сформульовано мету та завдання досліджень, визначено наукову новизну, зв'язок роботи з науковими темами, наведено відомості щодо апробації результатів наукових досліджень та їхньої практичної реалізації, вказано особистий внесок автора, структуру й обсяг дисертації.

У першому розділі «Феноменологічне підґрунтя використання імуноотропних сполук бактеріального походження та їхніх комплексів з есенційними біoelementами у якості функціональних харчових інгредієнтів та дієтичних добавок» (огляд літератури) обґрунтовано та систематизовано засади функціонального харчування, наведено сучасні класифікації функціональних харчових продуктів та інгредієнтів, визначено певні недоліки класифікації харчових інгредієнтів за функціональним призначенням. Визначено роль еубіотиків та постбіотиків у функціональному харчуванні, проаналізовано їхню фізіологічну дію на організм. Окреслено перспективу використання фрагментів пептидогліканів пробіотичних бактерій, а саме, муропептидів, які є потужними імуноотропними сполуками, у якості функціональних харчових інгредієнтів та складових дієтичних добавок для категорії населення, що страждає на розлади імунної системи. Наведено аналіз технологій існуючих імуноотропних препаратів на основі муропептидів та інших продуктів постбіотичного походження. Обґрунтовано доцільність наноконструювання хелатних структур есенційних біометалів, в яких субстанції мікробного походження виконують роль біолігандів.

У другому розділі «Програма, об'єкти та методи досліджень» наведено структуру проведення теоретичних, експериментальних та практичних досліджень, наведено процедури та послідовність досліджень, методи досліджень як загальнонаукові, так і специфічні (фізико-хімічні, хіміко-аналітичні, спектроскопічні, біохімічні, мікробіологічні, сенсорні, фізіологічні, статистичні).

Реалізацію програми наукових досліджень здійснювали в науково-дослідних лабораторіях ОНАХТ, а саме, лабораторії кафедри харчової хімії та експертизи, науково-дослідній лабораторії мікробіологічних досліджень ім. О.А. Кириленко, науково-дослідній лабораторії оцінки якості зерна та хлібопродуктів, консалтинговій лабораторії «ТЕРМА». Характеристику бактеріальних дезінтеграців, продуктів ферментолізу пептидогліканів, органічних комплексів біометалів, фізіологічної активності розроблених функціональних харчових інгредієнтів та дієтичних добавок здійснювали також в лабораторії НВП «Аріадна» (м. Одеса), дослідній лабораторії кафедри прикладної хімії та хімічної освіти Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова (м. Одеса), науково-дослідній лабораторії розробки та дослідження харчової продукції (Food research and development R&D LAB) Харківського державного університету харчування і торгівлі (м. Харків), багатопрофільній лабораторії ветеринарної медицини Одеського державного аграрного університету (м. Одеса), лабораторії промислової та екологічної токсикології ДП «Український НДІ медицини транспорту» МОЗ України (м. Одеса), лабораторії Одеського селекційно-

генетичного інституту Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення УААН (м. Одеса).

Наведено розроблені авторкою методики ідентифікації муропептидів у складі бактеріальних гідролізатів та визначення комплексоутворювальної ємності змішанолігандних органічних систем по відношенню до йонів металів.

Ефективність первинної дезінтеграції пробіотичних бактерій оцінювали методом мікроскопії, автолізу – визначенням амінокислот в автолізатах формольним титруванням та нінгідринним методом, ферментолізу – ідентифікацією у реакційному середовищі амінокислот, низькомолекулярних пептидів із реактивом Бенедикта після осадження високомолекулярних білкових фракцій розчином трихлороцтової кислоти. Фракційний склад нітрогеновмісних сполук автолізатів, дезінтегратів та ферментолізатів досліджували методом гель-хроматографії. Очищення продуктів деградації пептидогліканів проводили методом іонообмінної хроматографії. Амінокислотний склад та склад органічних кислот досліджували методом капілярного електрофору.

pH стабільність комплексів оцінювали за допомогою спектроскопічних методів та турбідиметрії, термостабільність – методом диференціальної скануючої калориметрії. Хімічну структуру муропептидів та комплексів досліджували методом ІЧ-спектроскопії. Рівномірність розподілу органічних комплексів біометалів при їхній іммобілізації на харчові волокна оцінювали атомно-адсорбційним методом.

Токсичність та фізіологічну активність розроблених інгредієнтів досліджували *in vivo* на щурах, використовуючи токсикологічні, гематологічні, біохімічні та імунологічні методи.

Оптимізацію режимів технологічних процесів поводити методом математичного моделювання, обробку експериментальних даних – статистичними методами.

У третьому розділі «Наукові основи отримання муропептидів шляхом деградації пептидогліканів пробіотичних культур» наведено підходи та розроблено методологію щодо деструкції пептидогліканів (ПГ) пробіотичних бактеріальних клітин із метою отримання імуноотропних муропептидів, як перспективних функціональних харчових інгредієнтів та складових дієтичних добавок.

У зв'язку з відсутністю доступних та простих у реалізації методів ідентифікації та кількісного визначення муропептидів (МП), розроблено спосіб, згідно якого вміст МП можна визначити за допомогою реакції їхньої вуглеводної складової (залишки глюкози у складі мурамової кислоти та N-ацетилглюкозаміну) із реактивом Антрона при використанні модельних муропептидів (мурамилдипептид (МДП)) для побудування калібрувального графіка (рис. 1). У межах концентрацій МДП 0,01–0,3 мг/см³, залежність інтенсивності забарвлення реакційного середовища від його концентрації носить лінійний характер. Коефіцієнт достовірності апроксимації $R^2 \approx 1$, що свідчить про високий ступінь відповідності трендової моделі до вихідних даних. Використання МДП у якості модельного зразка муропептидів для побудування калібрувального графіка забезпечує адекватність методу.

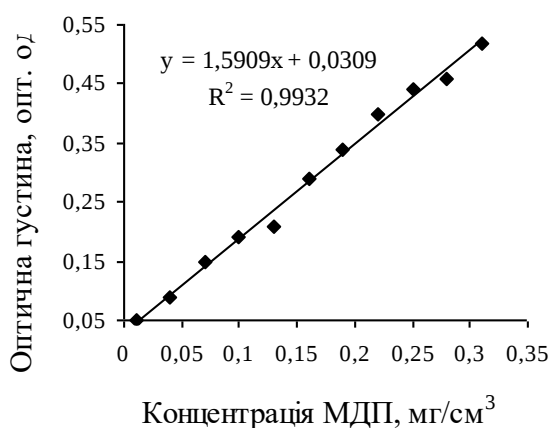


Рис. 1. Калібрувальний графік для визначення муропептидів

співставлення характеристик низки пробіотичних бактерій за їхніми біологічними властивостями, морфологією та податливістю до деградуючих факторів (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика морфологічних особливостей ПБ та складу гідролізатів пептидогліканів їхніх клітинних стінок (n=3, P≤0,05)

БМ	Морфологічні характеристики	Вміст продуктів ферментолізу, мг/см³		
		АК	НМП	НММП
<i>Lactobacillus acidophilus</i> K311124 (B-3190)	Зустрічаються короткі коковидні й покручені форми, а також довгі, ниткоподібні палички довжиною від 0.7–1.1 до 3.0–8.0 мкм, розташовані поодинокі або зібрані в ланцюжки.	13,15	4,86	1,42
<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i> B-3964		14,35	6,14	2,25
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 12L B-8238		12,04	3,23	1,07
<i>Lactobacillus plantarum</i> 77/9 B-2353		12,87	4,12	1,20
<i>Bifidobacterium bifidum</i> AC-1670	Поліморфні палички, розташовані поодинокі або утворюють одноклітинні ланцюжки, або скупчення. Бактерії не мають капсули, не утворюють спор, нерухомі і не розгалужуються. Розмір варіюється в межах 0,5–1,3×1,5–8 мкм	10,88	3,16	0,95
<i>Bifidobacterium longum subs. longum</i> AC-1635		11,18	3,44	1,08
<i>Streptococcus thermophilus</i> B-3808	Клітини молочнокислих стрептококів мають сферичну або овальну форму діаметром 0,5–1,2 мкм, розташовуються попарно або у вигляді ланцюжків різної довжини.	7,36	2,14	0,42
<i>Lactococcus lactis subs. Lactis</i> 1473 B-3466		8,14	1,73	0,28
<i>Lactococcus lactis subs. Cremoris</i> BH-5 B-3963		6,82	1,86	0,35

Найвищий вміст цільових продуктів деградації ПГ має місце у випадку дезінтеграції лактобацил, лактококи піддаються дезінтеграції важче, про що свідчить значно менший вміст амінокислот (АК), низькомолекулярних пептидів (НМП) та низькомолекулярних муропептидів (НММП) у дезінтегратах. Якщо порівнювати результати дезінтеграції лактобацил та біфідобактерій, то суттєвої різниці у накопиченні цільових продуктів ферментолізу немає, але беручи до уваги теоретичні дані про можливі опортуністичні властивості біфідобактерій, а також відсутність інформації щодо детальної структури ПГ їхніх клітинних стінок, а саме наявності ділянок, здатних активізувати NOD 1 та NOD 2 імунокомпетентні рецептори, що є пріоритетом при виборі об'єкту для дезінтеграції ПГ з метою отримання МП та їхніх низькомолекулярних похідних, використання біфідобактерій з цією метою є невиправданим.

Таким чином, для отримання низькомолекулярних МП як функціональних харчових інгредієнтів (ФХІ) та компонентів дієтичних добавок (ДД), перспективним є використання лактобацил, а саме, *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* B-3964, у структурі пептидоглікану яких присутні цільові ділянки, окрім того, лактобацили володіють низкою беззаперечних біологічних ефектів та краще піддаються дезінтеграції порівняно з іншими видами пробіотичних бактерій.

Із метою розроблення методології отримання низькомолекулярних муропептидів пробіотичного походження, здійснено комплексний підхід із залученням найбільш перспективних та маловивчених методів дезінтеграції та лізису ПГ. Доцільним є використання ендogenous лізуючого потенціалу лактобацил, а саме, здатності до продукування автолізинів, що може приводити до автолізу та деградації власних клітин. Автоліз біомаси (БМ) проводили в кінці логарифмічної фази росту, коли мало місце максимальне накопичення біомаси, пептидоглікан якої є субстратом для отримання муропептидів, проте на даному етапі оболонки бактерій є досить лабільними до дії деградуючих факторів. Автоліз досліджували також після стаціонарної фази росту. Процеси здійснювали за різних температурних режимів та значень рН середовищ (рис. 2, 3).

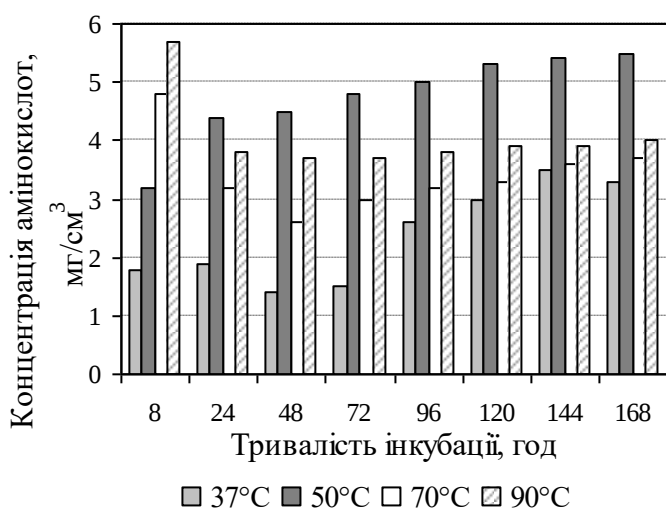


Рис. 2. Порівняльна динаміка накопичення амінокислот в автолізатах при різних температурах експозиції (рН 4,2)

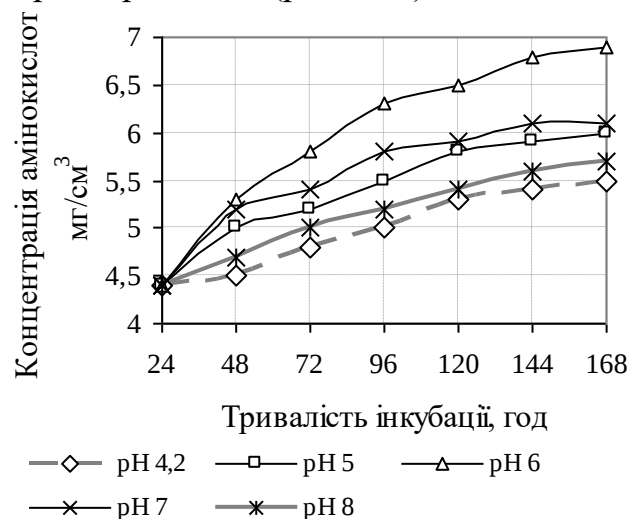


Рис. 3. Динаміка накопичення амінокислот в автолізатах при різних значеннях рН середовища (за температури 50°C)

Ефективність автолізу оцінювали за накопиченням АК у реакційних середовищах. Максимальне накопичення АК в автолізатах має місце при обробці БМ за температури 90°C на 8-й год та при 50°C на 144 год культивування. Вивільнення АК у першому випадку обумовлено агресивною дією високої температури, у другому – дією ферментативної системи, направленої на гідроліз специфічних зв'язків клітинних структур бактерій, що є пріоритетним у розрізі даної роботи. Враховуючи незначну різницю (2%) у накопиченні АК при 120 та 144 год інкубації, раціональним є наступний режим автолізу – 120 год при 50°C.

При зміні рН у лужну сторону, після стаціонарної фази росту (24 год) відбувається активування автолізинів, спрямоване саме на деградацію клітинних структур бактерій. Найвищий вміст амінокислот у реакційному середовищі має місце при рН 6, яке є оптимальним для каталітичної дії автолізинів. Результати мікроскопічного дослідження автолізату БМ (рис.4), отриманого за режимів автолізу рН 6, 50°C, 120 год, свідчать про ефективність обраного режиму як способу деструкції клітинних стінок лактобацил, оскільки переважна більшість клітин втратила цілісність

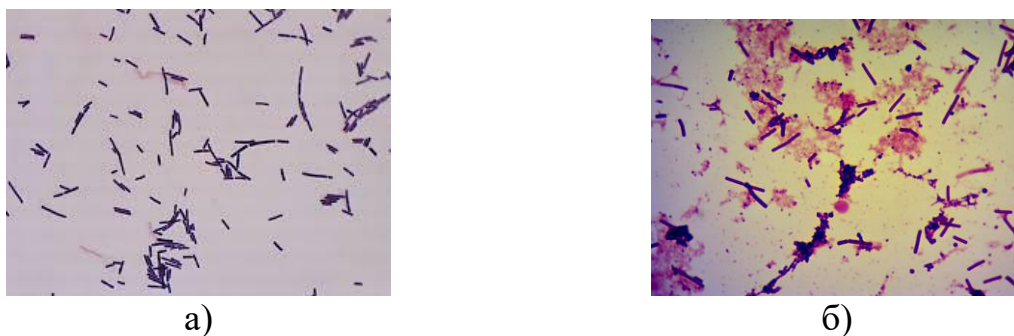


Рис. 4. Мікрофотографії біомаси до (а) та після автолізу (б)

Результати гель-хроматографічних досліджень нітрогеновмісних сполук рідкої фази автолізату показали, що у його складі присутні сполуки з молекулярною масою у діапазоні, що відповідає молекулярній масі муропептидів, але їхня кількість є досить незначною (0,62 мг/см³). Отже, застосування автолізу для дезінтеграції лактобацил не забезпечує глибоке перетворення ПГ. Автолітичні процеси доцільно розглядати у якості первинного етапу деструкції бактеріальних клітин.

Із метою визначення доцільності застосування для часткової деструкції клітинних оболонок бактерій обробку ультразвуком та мікрохвилями надвисокої частоти (НВЧ), здійснено порівняльну характеристику дезінтегратів БМ *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* B-3964, отриманих при паралельному застосуванні цих факторів впливу (табл. 2,3).

Наведені дані свідчать, що максимальний вміст АК у дезінтеграті, отриманому при дії НВЧ-випромінювання складає 4,82 мг/см³, НМП – 0,33 мг/см³, а при обробці БМ УЗ – 5,2 мг/см³ АК та 0,58 мг/см³ НМП (майже на 20% вище). Таким чином, більш ефективним є дезінтегруючий вплив УЗ. Накопичення НМП, що в основній мірі відповідають за імунотропні властивості, є незначним у всіх варіаціях процесів дезінтеграції. Тому на наступному етапі проводили деструкцію лактобацил з використанням комбінації автолізу та фізичних деградуючих факторів, результати досліджень наведено в табл. 4.

Таблиця 2

Характеристика дезінтегратів БМ,
отриманих шляхом обробки
ультразвуком (n=3, P≤0,05)

Спосіб обробки		Хар-ка дезінтеграту	
		АК, мг/см ³	НМП, мг/см ³
Контроль (БМ)		1,24	0,14
Обробка УЗ частотою 25 кГц	60 с	1,92	0,18
	300 с	3,16	0,28
	600 с	4,27	0,53
	900 с	4,91	0,57
Обробка УЗ частотою 35 кГц	60 с	1,95	0,14
	300 с	3,68	0,26
	600 с	5,12	0,58
	900 с	5,15	0,58
Обробка УЗ частотою 40 кГц	60 с	2,23	0,16
	300 с	3,72	0,33
	600 с	5,26	0,58
	900 с	5,33	0,58

Таблиця 3

Характеристика дезінтегратів БМ,
отриманих шляхом обробки хвилями НВЧ
(n=3, P≤0,05)

Зразки		Хар-ка дезінтеграту	
		АК, мг/см ³	НМП, мг/см ³
Контроль (БМ)		1,24	0,14
Культуральна рідина, (СР 7%)	60 с	1,28	0,14
	120с	1,31	0,22
	180 с	1,77	0,28
	300 с	2,25	0,31
Концентрат біомаси (СР 60%)	60 с	2,54	0,26
	120с	3,51	0,29
	180 с	4,82	0,33
	300 с	5,13	0,35
Концентрат біомаси +NaCl (СР 63%)	60 с	2,68	0,25
	120с	3,85	0,29
	180 с	5,14	0,37
	300 с	5,58	0,41

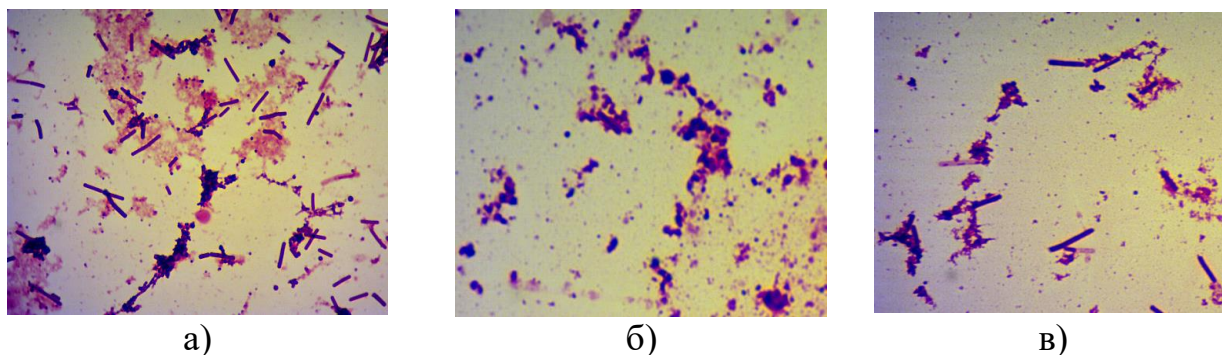
Таблиця 4

Характеристика дезінтегратів біомаси,
отриманих шляхом обробки автолізу
ультразвуком та хвилями НВЧ
(n=3, P≤0,05)

Спосіб обробки		Хар-ка дезінтеграту	
		АК, мг/см ³	НМП, мг/см ³
Контроль (автолізат БМ)		5,62	0,62
Обробка автолізу УЗ 35 кГц	60 с	5,82	0,64
	300 с	6,48	0,71
	600 с	7,18	0,85
	900 с	7,44	0,92
Обробка автолізатів хвилями НВЧ	60 с	5,66	0,62
	120с	5,85	0,64
	180 с	6,12	0,72
	300 с	6,18	0,74

Результати такої комбінованої обробки значно підвищують ефективність дезінтеграції лактобацил, про що свідчить збільшення вмісту низькомолекулярних продуктів деструкції у дезінтегратах автолізатів, порівняно з дезінтегратами біомаси, яку не піддавали автолізу. Найвищий вміст АК та НМП має місце при обробці автолізу ультразвуком протягом 900 с, але раціональним є режим з тривалістю 600 с, вміст АК при цьому менший всього на 4%, а НМП – на 8%. Результати мікроскопії зразків, зображено на рис. 5.

У складі ультразвукового дезінтеграту БМ, яку попередньо піддавали автолізу, методом гель-хроматографії, встановлено присутність пептидів з молекулярною масою у діапазоні, що відповідає молекулярній масі МДП. Концентрація НМП у складі розчинної фази дезінтеграту лактобацил, отриманого шляхом ультразвукової обробки автолізу біомаси, складає 0,94 мг/см³, проте вміст високомолекулярних фракцій нітрогеновмісних сполук залишається високим, що зумовлює доцільність їхньої подальшої фрагментації із залученням специфічних ензимів, здатних каталізувати розщеплення пептидних та глікозидних (β 1→4) зв'язків пептидоглікану.



5. Мікрофотографії автолізу біомаси до (а) та після його дезінтеграції під впливом ультразвуку (б) та НВЧ-випромінюванням (в)

У якості протеаз для фрагментації пептидогліканів використовували комплексний ферментний препарат тваринного походження панкреатин, фермент рослинного походження – папаїн, мікробіального – протосубтилін, у якості мурамідози – лізоцим.

Результати досліджень протеолізу пептидогліканів БМ, яку не піддавали попередній обробці наведено на рис. 6-7, попередньо дезінтегрованих клітин – на рис. 8. Ефективність оцінювали за накопиченням НМП у ферментолізатах.

Найвищим вмістом НМП характеризується лізат (рис. 6,7), який отримували з використанням папаїну. Максимальне накопичення НМП у ньому складає $2,6 \text{ мг/см}^3$ при тривалості ферментолізу 240 хв. Лізати, які отримували з використанням панкреатину та протосубтиліну, характеризуються дещо меншим вмістом НМП.

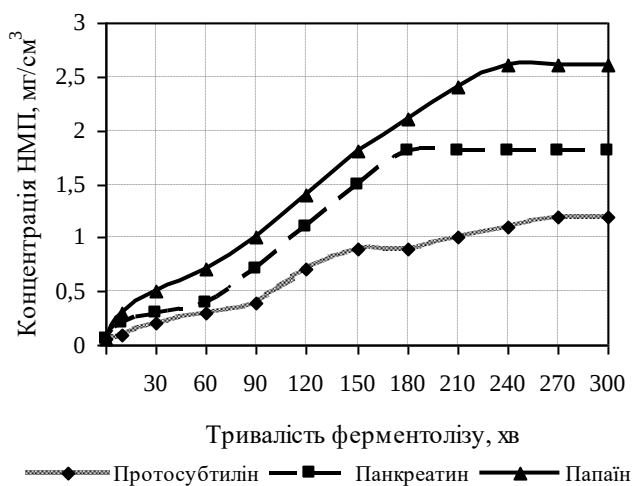


Рис. 6. Залежність накопичення НМП у лізатах *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* B-3964 від тривалості процесу ферментолізу

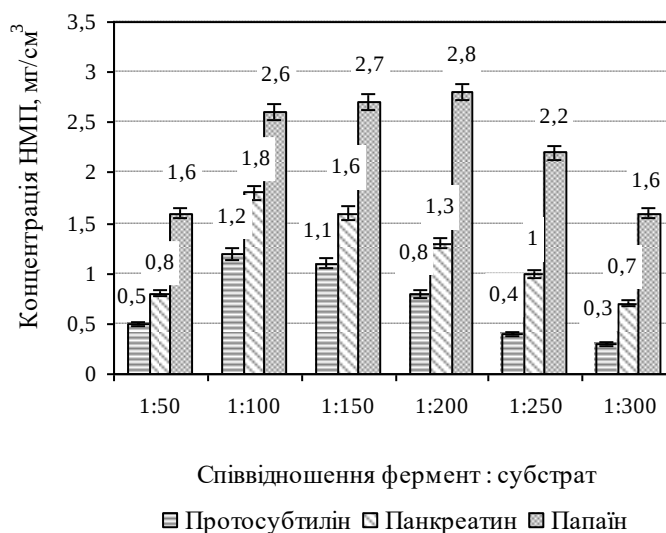


Рис. 7. Залежність накопичення НМП у лізатах *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* B-3964 від співвідношенні фермент : субстрат

Максимальна кількість НМП у лізаті, отриманому при обробці папаїном, складає $2,8 \text{ мг/см}^3$ при співвідношенні фермент:субстрат 1:200, при обробці панкреатином – $1,8 \text{ мг/см}^3$ при співвідношенні фермент:субстрат 1:100, при обробці протосубтиліном – $1,2 \text{ мг/см}^3$ при аналогічному співвідношенні. Такий характер ферментолізу різними протеазами можна пояснити їхньою субстратною

специфічністю. Папаїн каталізує пептидні зв'язки, побудовні за участю аргініну, лізину, гліцину. Окрім того, папаїн володіє бактерицидною та бактеріостатичною дією, оскільки має здатність до лізису бактеріального пептидоглікану не лише за рахунок протеолізу, а й наявності естеразної та амідазної активності. Щодо панкреатину, до складу якого входять протеази трипсин та хімотрипсин, та протосубтиліну – їхня субстратна специфічність дещо вища, ніж у папаїну, тому і ймовірність гідролізу специфічних зв'язків у складі пептидоглікану менша.

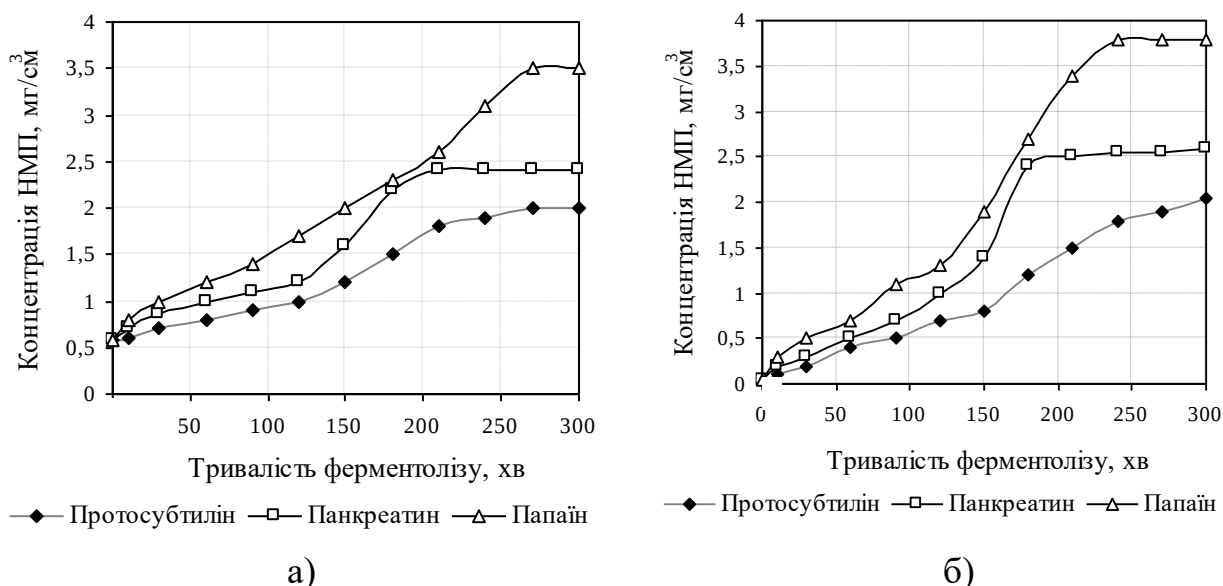


Рис. 8 Динаміка накопичення НМП у ферментолізатах

Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus B-3964: а) ферментоліз ПГ ультразвукового дезінтеграту БМ; б) ферментоліз ПГ автолізу БМ

Вміст НМП в ферментолізатах клітин, які попередньо піддавали автолізу, значно вищий порівняно з таким ферментолізату нативних лактобацил (рис. 8) (при гідролізі панкреатином – на 31%, папіном – на 26%, протосубтиліном – на 41%), а також дещо вищий, ніж у ферментолізатах ультразвукових дезінтегратів. Так, вміст НМП у реакційному середовищі при протеолізі ПГ автолізу БМ на 8% більший, ніж при протеолізі ПГ ультразвукового дезінтеграту. Оскільки процеси автолізу відбуваються під дією ендогенних автолізинів, що є специфічними ензимами, направленими на руйнування пептидоглікану за рахунок гідролізу глікозидних та пептидних зв'язків, це може обумовлювати не тільки послаблення ригідності пептидогліканового шару, як у випадку ультразвукової обробки, а й до зменшення ступеня полімеризації ПГ, що слугуватиме передумовою для більш ефективного ферментолізу із залученням екзогенних ензимів.

Застосування попередньої обробки БМ є виправданим, про що свідчать данні табл. 5, в якій наведено порівняльну характеристику продуктів гідролізу ПГ БМ *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* B-3964, яку попередньо піддавали автолізу та УЗ обробці, у тому числі наведено кількості цільових компонентів – низькомолекулярних муропептидів (НММП). Лізат I отримано за участю панкреатину, лізат II – протосубтиліну, лізат III – папаїну.

Вміст муропептидів у реакційних середовищах при ферментолізі ПГ і автолізу, і УЗ дезінтеграту, усіма досліджуваними протеазами значно вищий,

ніж при ферментолізі нативної БМ (табл. 5). Ферментативна деградація ПГ попередньо дезінтегрованої біомаси папаїном, порівняно з іншими протеазами, є більш ефективною, про що свідчить максимальне накопичення муропептидів – 2,46 мг/см³.

Таблиця 5

Характеристика лізатів біомаси *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* B-3964

(n=3, P≤0,05)

Зразок	Характеристика ферментолізатів		
	АК, мг/см ³	НМП, мг/см ³	НММП, мг/см ³
Автолізат	6,83	0,62	0,08
УЗ дезінтеграт	5,12	0,58	0,0
<i>Ферментолізат ПГ БМ, яку попередньо піддавали автолізу</i>			
Лізат I	4,18	2,64	1,28
Лізат II	3,82	2,05	0,82
Лізат III	5,53	3,82	2,46
<i>Ферментолізат ПГ БМ, яку попередньо піддавали УЗ обробці</i>			
Лізат I	7,12	2,38	0,75
Лізат II	6,68	1,94	0,49
Лізат III	9,56	3,53	1,76

На наступному етапі визначено закономірності протеолізу ПГ БМ, яку попередньо почергово піддавали автолізу та ультразвуковій обробці. У даному експерименті було значно збільшено час ферментолізу – до 25 год, на відміну від попередніх 5 год (табл. 6). Оскільки раніше не спостерігалась тенденція до зменшення НМП у реакційному середовищі, то припустили, що для більш глибоких перетворень ПГ, який представляє собою багат шарову решітку, доцільно збільшити час інкубації ферменту з субстратом.

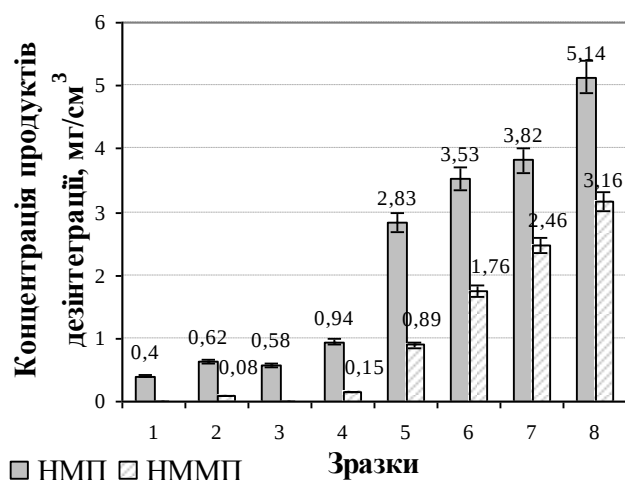
Таблиця 6

**Характеристика лізатів ПГ БМ, почергово дзінтегрованої
за рахунок автолізу та обробки УЗ (n=3, P≤0,05)**

Співвідношен ня фермент: субстрат	Тривалість обробки, год											
	1		5		10		15		20		25	
	АК	НМП	АК	НМП	АК	НМП	АК	НМП	АК	НМП	АК	НМП
Панкреатин												
1:50	7,28	0,85	7,71	1,12	8,44	1,75	9,35	2,76	11,54	2,58	12,35	2,12
1:100	8,14	1,44	9,28	1,85	10,25	2,76	10,78	3,36	11,23	4,11	14,82	3,55
1:200	7,55	0,88	8,14	1,22	8,86	1,85	9,14	2,16	9,85	2,75	12,38	2,04
1:300	7,31	0,84	7,58	1,18	8,54	1,77	8,75	1,94	9,12	2,07	11,47	1,53
Папаїн												
1:50	7,41	0,85	7,94	1,12	8,57	1,75	9,44	2,76	11,98	2,36	12,78	1,84
1:100	8,75	1,63	10,22	2,25	11,35	3,18	13,15	4,86	15,01	4,15	15,34	3,43
1:200	8,10	1,15	9,15	4,45	9,81	5,14	10,28	5,13	10,64	4,75	12,44	3,87
1:300	7,38	1,02	8,47	1,21	8,74	1,95	9,05	2,03	9,65	1,84	11,67	1,50
Протосубтилін												
1:50	7,20	0,85	7,25	0,87	7,43	1,02	7,78	1,12	7,82	1,14	7,95	1,18
1:100	7,25	0,86	7,28	2,87	7,47	2,06	7,81	2,15	7,88	2,21	8,27	2,22
1:200	7,35	0,94	7,68	1,22	7,94	1,36	8,31	1,45	8,82	1,84	9,36	2,18
1:300	7,28	0,84	7,33	1,14	7,38	1,21	7,75	1,34	8,27	1,65	8,45	1,93

Результати, наведені у табл. 6 підтверджують правомірність цього припущення – адже, максимальне накопичення НМП у ферментолізаті, отриманому за участю папаїну мало місце на 10-й годині гідролізу та складало $5,14 \text{ мг/см}^3$, панкреатину – на 20-й годині гідролізу ($4,11 \text{ мг/см}^3$), протосубтиліну – на 25-й годині ($2,22 \text{ мг/см}^3$).

Порівняльну характеристику ефективності різних варіацій дезінтеграції лактобацил із та без участі протеолізу папаїном, який виявився найбільш дієвою серед досліджуваних протеаз у контексті зазначеної мети, наведено на рис. 9. Накопичення НМП та цільових НММП є максимальним у випадку комбінування наступних факторів (зразок 8): автолізу, УЗ обробки та ферментолізу папаїном.



зразок 1 – контроль (розчинна фаза суспензії нативних бактеріальних клітин);
 зразок 2 – автолізат БМ;
 зразок 3 – УЗ дезінтегрat БМ;
 зразок 4 – дезінтегрat БМ, отриманий комбінуванням автолізу та УЗ;
 зразок 5 – ферментолізат БМ, отриманий за участю папаїну;
 зразок 6 – ферментолізат УЗ дезінтеграту БМ, отриманий за участю папаїну;
 зразок 7 – ферментолізат автолізу БМ, отриманий за участю папаїну;
 зразок 8 – ферментолізат БМ, яку по чергово піддавали автолізу та обробці УЗ, отриманий за участю папаїну

Рис. 9. Порівняльна характеристика ефективності різних варіацій дезінтеграції лактобацил

Експерименти з вивчення закономірностей ферментолізу ПГ біомаси, дезінтегрованої за визначеними вище параметрами, композицією найбільш ефективної протеази папаїну та мурамідази лізоциму проводили при залученні математичного моделювання за планом другого порядку Бокса типу В₃, що містить 15 дослідів. Рівні факторів та умови проведення дослідів, а також їхні результати наведено у табл. 7.

Після проведення дослідів та обробки їхніх результатів за програмою PLAN, отримано рівняння регресії у натуральних змінних. Статистична оцінка цього рівняння за критерієм Фішера ($F_p = 1,13 < F_{кр} = 19,37$) показала його адекватність експериментальним даним, що дозволяє використовувати його для опису залежності концентрації $C_{НМП}$ (мг/см^3) від факторів C_L , C_p і τ , а також для обґрунтування раціональних умов проведення ферментолізу. Отримане рівняння має такий вигляд:

$$C_{НМП} = 2,637 - 0,8075C_L + 0,3975C_p + 0,6818\tau + 0,05191C_L^2 - 0,01702C_p^2 - 0,02581\tau^2, \quad s=0,11.$$

Визначено умови максимального накопичення низькомолекулярних пептидів $C_{НМП}$. Отримано раціональні умови проведення ферментолізу пептидогліканів БМ, тобто значення факторів C_L , C_p та τ , а також максимальне розрахункове значення $C_{НМП}$:

$$C_L = 5,00 \cdot 10^{-2} \text{ мг/см}^3, \quad C_p = 11,67 \cdot 10^{-2} \text{ мг/см}^3, \quad \tau = 13,21 \text{ год}, \quad C_{НМП} = 6,72 \text{ мг/см}^3$$

Матриця плану дослідів і результати залежності накопичення НМП у ферментолізаті при використанні композиції ферментів лізоцим:папаїн

№ досліду	Умови дослідів			Результати дослідів		
	C_L	C_P	τ	$C_{НМПсер}$	$C_{НМПр}$	δ
	$\cdot 10^{-2} \text{ мг/см}^3$		год	мг/см^3	мг/см^3	
1	5	10	5	5,00	4,93	1,32
2	10	10	5	4,68	4,79	2,35
3	5	20	5	3,65	3,80	4,16
4	10	20	5	3,80	3,66	3,74
5	5	10	18	6,21	6,08	2,10
6	10	10	18	5,88	5,94	0,95
7	5	20	18	4,94	4,95	0,16
8	10	20	18	4,80	4,80	0,08
9	5	15	11,5	6,42	6,46	0,57
10	10	15	11,5	6,34	6,31	0,43
11	7,5	10	11,5	6,17	6,20	0,50
12	7,5	20	11,5	5,09	5,07	0,41
13	7,5	15	5	4,45	4,40	1,19
14	7,5	15	18	5,48	5,54	1,15
15	7,5	15	11,5	6,08	6,06	0,32

Наочно характер попарного впливу факторів C_L , C_P та τ на процес накопичення низькомолекулярних пептидів $C_{НМП}$ у ферментолізаті показано на рис. 10 у вигляді поверхонь відгуку. При цьому значення третіх факторів були прийняті на екстремальному (раціональному) рівнях, зазначених на рисунках.

Проведено експериментальну перевірку розрахованих раціональних умов процесу ферментолізу, вміст НМП складав у середньому $6,58 \text{ мг/см}^3$, а вміст цільових НММП – $4,35 \text{ мг/см}^3$, що $\approx 30\%$ більше, ніж у випадку ферментолізу виключно папаїном.

Гель-хроматографічне дослідження нітрогеновмісних сполук рідкої фази ферментолізату (рис. 11), отриманого за комбінованої обробки, також підтверджує наявність сполук з молекулярної масою в діапазоні 300–700 Да, яка є характерною для низькомолекулярних імунотропних мулопептидів.

Низькомолекулярні нітрогеновмісні сполуки рідкої фази ферментолізату досліджено методом ІЧ-спектроскопії. Аналіз ІЧ-спектрів зразків підтвердив наявність специфічних груп та хімічних зв'язків, характерних для первинної структури ПГ, та відсутність процесів хімічної модифікації функціональних груп НММП при використанні сукупності запропонованих прийомів обробки мікробіальної маси, що є однією з передумов його безпечності.

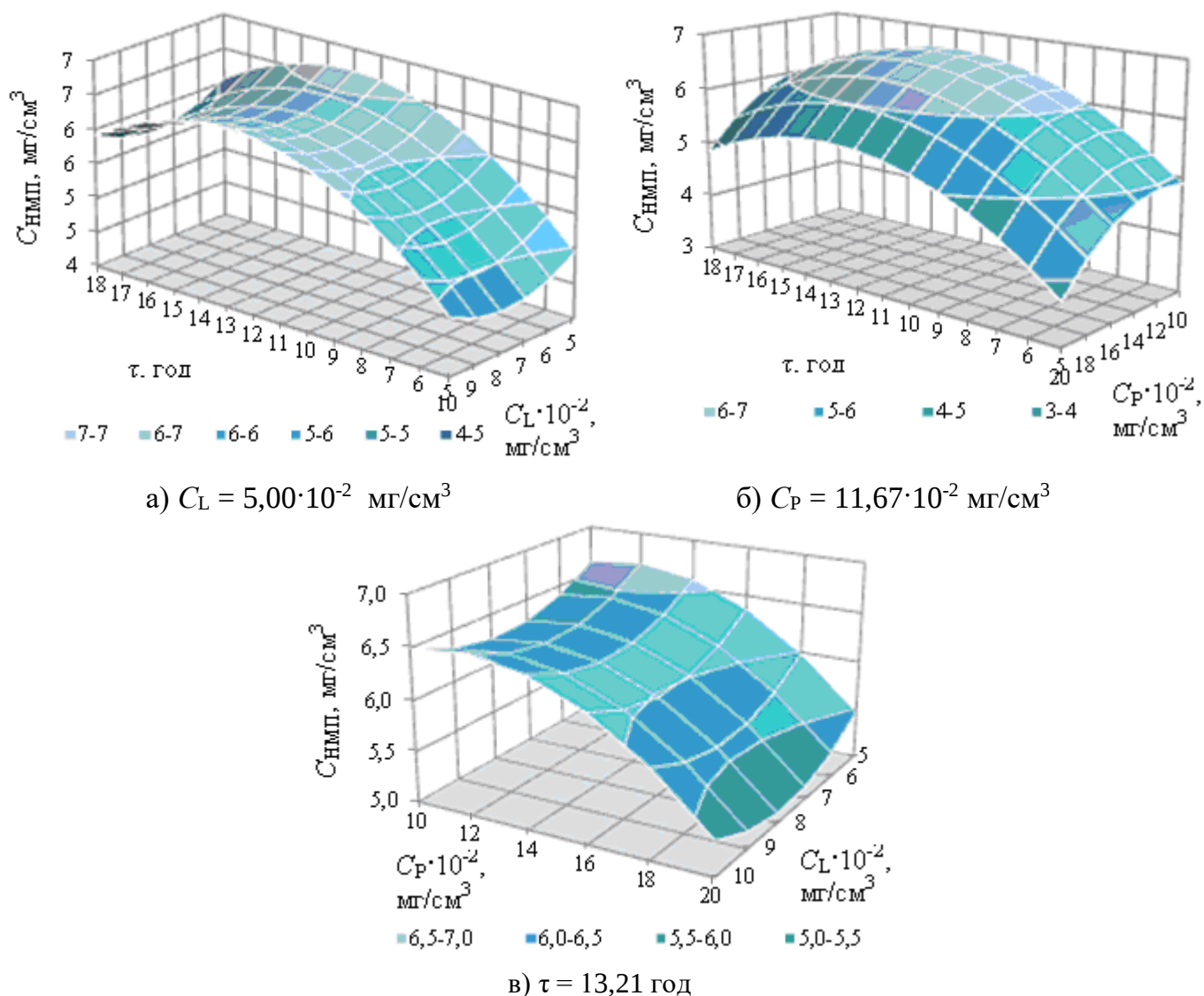


Рис. 10. Поверхні відгуку залежності S_{NMP} від факторів C_L , C_P та τ

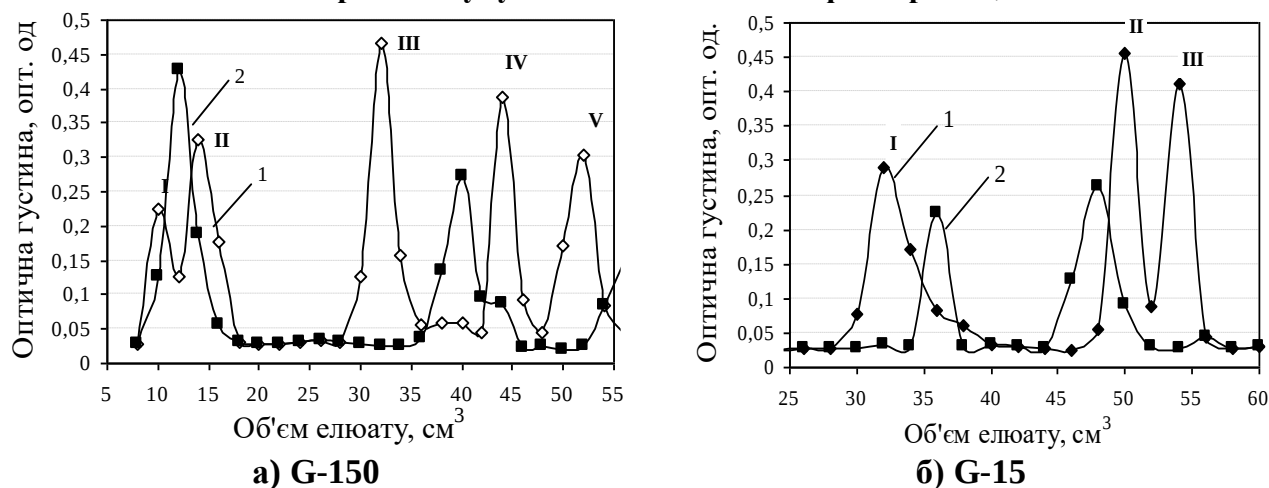


Рис. 11. Гель-хроматографія нітрогеновмісних сполук рідкої фази ферментолізату

1 – гель-хроматографічна крива з маркерами: **G-150** – I – фосфорилаза (97 кДа),

II – бичачий сироватковий альбумін (65 кДа), III – яєчний альбумін (45 кДа),

IV – карбогідраза (30 кДа), V – лактоальбумін (14 кДа);

G-15 – I – ГМДП (ММ 650 Да), II – аспартам (L-Аспартил-L-фенилаланин, ММ 294 Да),

III – гліцин (ММ 75 Да). 2 – гель-хроматографічна крива дослідного зразка

У цілому, проведено системний аналіз щодо направленої біотрансформації пептидогліканів пробіотичного походження, що дозволяє доповнити та удосконалити класичну класифікацію методів дезінтеграції бактерій такими факторами впливу як автоліз, обробка хвилями НВЧ, яка досі вважалась не ефективним методом дезінтеграції, та рядом комбінованих методів. Комплексний підхід до питання дезінтеграції лактобацил, а саме, вивчення можливості використання едогенного ензиматичного потенціалу (автолізинів), фізичних факторів впливу (випромінювання НВЧ та обробку УЗ), протеолізу, комбінованих методів фрагментації ПГ, дозволили обґрунтувати методологію та раціональні режими ферментативного гідролізу ПГ УЗ дезінтеграту автолізату біомаси за участю комбінації лізоциму та папаїну, що забезпечує максимальне накопичення цільових імунотропних НММП.

У четвертому розділі «Науково-практичне обґрунтування отримання органічних комплексів біометалів зі змішанолігандними системами постбіотичного походження» наведено результати дослідження особливостей наноконструювання біодоступних форм деяких металів шляхом їхнього комплексоутворення з продуктами метаболізму та переробки лактобацил.

У зв'язку з існуванням проблеми коректного визначення комплексоутворювальної ємності змішанолігандних органічних систем по відношенню до іонів металів, які мають невизначений склад органічних лігандів, розроблено метод, що дозволяє визначити даний показник для змішанолігандних органічних систем невстановленої дентантності.

Оскільки відомо, що іони металів утворюють з натрієм карбонатом нерозчинні солі, які провокують помутніння реакційної суміші, в основу даного методу покладено гіпотезу про те, що іон металу у зв'язаній органічній формі не може взаємодіяти з натрієм карбонатом, утворюючи нерозчинні солі, які забезпечують помутніння системи, на відміну від вільних іонів металів. Таким чином, при насиченні змішанолігандної системи іонами металів, їхній комплексоутворювальний потенціал вичерпується, і присутність іонів у не зв'язаній неорганічній формі обумовлює зміну показника мутності системи у присутності натрію карбонату.

Прийнятність даної гіпотези доводили шляхом реалізації розробленого методу при отриманні органічних комплексів біометалів зі змішанолігандними системами постбіотичного походження. Для утворення металокомплексів у якості біолігандів використовували продукти деструкції пептидоглікану *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus B-3964*. Деструкцію пептидоглікану клітинних стінок БМ проводили за процедурою, наведеною вище. У результаті, отримали суміш амінокислот та НМП, концентрація яких складає відповідно 13,24 мг/см³, 6,58 мг/см³. Додатково до реакційного середовища вводили молочну кислоту у кількості 20 мг/см³. Комплексоутворювальну ємність змішанолігандних органічних систем по відношенню до іонів металів досліджували розробленим способом, який засновано на турбідиметричній детекції нерозчинних форм карбонатів/гідроксидів металів, які утворюються при взаємодії вільних іонів металів з натрієм карбонатом після насичення системи

лігандів біометалами. Мутність змішанолігандних систем у присутності іонів біометалів та Na_2CO_3 (рис. 12) є мінімально стабільною (0,025 опт. од.) до досягнення в суміші певної концентрації металу. Стрімкий ріст мутності системи, що містить іони Mg^{2+} має місце за концентрації їх у суміші $24 \text{ моль/дм}^3 \cdot 10^{-2}$, Ca^{2+} – $28 \text{ моль/дм}^3 \cdot 10^{-2}$, Fe^{3+} – $32 \text{ моль/дм}^3 \cdot 10^{-2}$. Така поведінка досліджуваних систем свідчить про те, що до досягнення даних концентрацій, метал знаходиться у зв'язаному стані у складі змішанолігандних комплексів, що унеможлиблює його взаємодію з присутнім у системі натрієм карбонатом та появу нерозчинних частинок феруму гідроксиду або магнію/кальцію карбонату, які й обумовлюють помутніння системи.

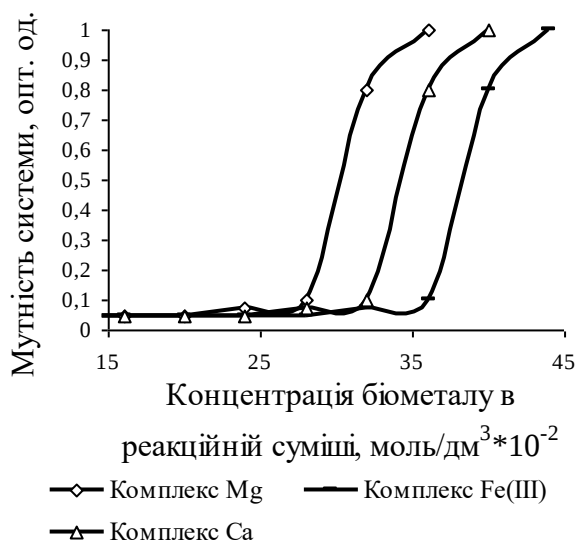


Рис. 12. Залежність мутності змішанолігандної системи пробіотичного походження від вмісту іонів біометалів у присутності Na_2CO_3

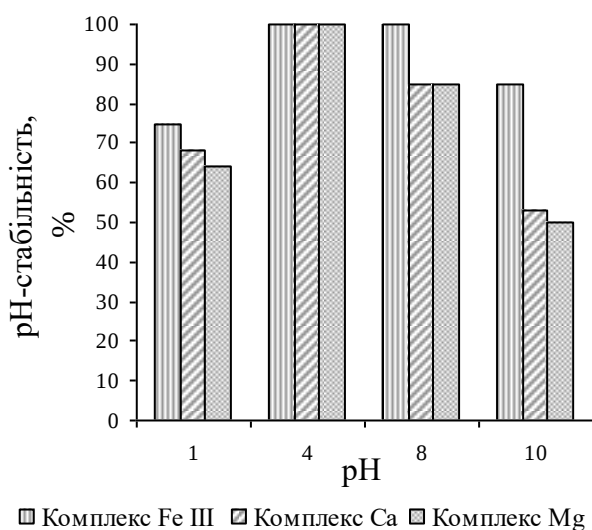


Рис. 13. рН-стабільність комплексів

Оскільки хелатні комплекси біометалів з продуктами переробки БМ *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus B-3964* планується використовувати у якості дієтичних добавок та функціональних харчових інгредієнтів, вивчено їхню поведінку при різних значеннях рН середовища (рис. 13) та температур (табл. 8).

Виходячи із наведених даних, найбільшою рН стабільністю володіє комплекс, утворений за участю Fe^{3+} . Комплексоутворювач Fe^{3+} має d^2sp^3 гібридизацію атомних орбіталей та може обумовлювати утворення октаедричної форми комплексу з біолігандами, що пояснює значну стабільність в середовищах із різною активністю іонів. Стабільність отриманого комплексу в інтервалі рН 8–10 дозволяє прогнозувати можливість присутності фери-іону у розчиненому стані в тонкому кишківнику, де і відбувається його абсорбція ентероцитами.

Комплекси Ca та Mg також є достатньо стабільними в широкому діапазоні рН. Так, за найбільш агресивних значень рН 1 та рН 10 стабільність комплексу Mg складає відповідно 64 та 50%, Ca – 68 та 53%.

Вірогідно, достатньо висока стабільність отриманих комплексів пояснюється сприянням змішанолігандних полідентантних систем посиленню «хелатного ефекту», оскільки

комплексоутворення металів з полідентантними лігандами є більш вигідним із позицій термодинаміки, порівняно з монодентантними лігандами. Стійкість хелатів при підвищених значеннях рН обумовлено також конкуренцією між іонами металу і протоном розчину за аніон хелатного ліганда.

Задля прогнозування поведінки отриманих хелатних комплексів у складі харчових систем, які можуть піддавати температурній обробці, проведено їхній аналіз методом диференціальної скануючої калориметрії (ДСК) (табл. 8). При порівнянні даних аналізу ДСК можна констатувати, що початкова втрата маси комплексами починається за температури 44–52°C, зразками механічної суміші – при 55–60°C. У діапазоні температур 118–180°C спостерігається ендотермічна реакція, причому термічні ефекти при обробці механічної суміші відсутні. Присутність ендотермічних термоефектів на термограмах комплексів, може свідчити про наявність у їхній структурі хелатних зв'язків, при руйнуванні яких відбуваються зміни ентальпії процесу.

Таблиця 8

Термоефекти та втрата маси при термогравіметричному дослідженні зразків (n=3, P≤0,05)

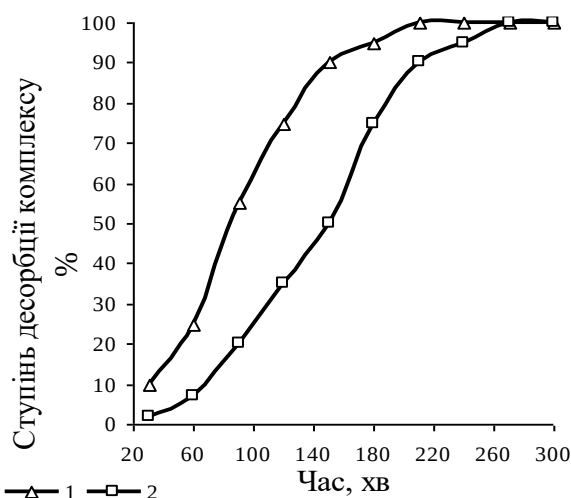
Зразки	Інтервал температур, °C	Максимум, °C	Термоефект	Втрата маси, %
Комплекс Са	49–122 122–178	– 140–145	– ендотермічний	3,00 18,50
Механічна суміш компонентів комплексу Са	59–122 122–178	– –	– –	7,00 16,00
Комплекс Mg	44–118 118–173	– 139–143	– ендотермічний	4,00 17,80
Механічна суміш компонентів комплексу Mg	55–120 120–173	– –	– –	6,25 16,40
Комплекс Fe (III)	52–125 125–180	– 140–145	– ендотермічний	3,80 19,60
Механічна суміш компонентів комплексу Fe (III)	60–125 125–180	– –	– –	7,30 17,50

Оскільки умови отримання комплексів передбачають використання розбавлених розчинів їхніх складових, при розробленні технологій дієтичних добавок та харчових інгредієнтів на їхній основі, можуть виникати проблеми концентрування, сушіння та дозування. Із метою позбавлення перелічених недоліків, проводили іммобілізацію отриманих комплексів на харчові волокна пшеничних висівок (ХВПВ). У табл. 9 наведено характеристику рівномірності розподілу органічної форми феруму на ХВПВ за різних режимів іммобілізації. Результати досліджень показали, що найбільш ефективним виявилось використання ГМ 1:5 та 1:10, що забезпечують рівномірний розподіл комплексу біометалу по всьому об'єму волокон. За даних режимів має місце мінімальне квадратичне відхилення від середнього значення відібраних проб.

**Характеристика рівномірності розподілу органічної форми феруму на ХВПВ
за різних режимів іммобілізації**

ГМ ХВ:комплекс	Вміст елементарного Феруму, мг/кг					$\bar{X}$	s	Var
	Проба							
	1	2	3	4	5			
1:2	1645,4	1456,8	1819,1	1715,5	1956,3	1718,62	167,63	35127,16
1:5	1815,7	1892,4	1860,2	1854,2	1831,6	1850,82	29,28	857,78
1:10	1838,2	1809,7	1866,5	1885,2	1841,2	1848,16	28,87	833,78

Так як використання ФХІ, у тому числі органічної форми феруму, передбачено для нутритивного вживання, доцільним є вивчення закономірності десорбції комплексу Fe (III) із матриці ХВПВ при екстрагуванні водою та розчинами, що відповідають рН відділам шлунково-кишкового (ШКТ) (рис. 14).



**Рис. 14. Десорбція комплексу Fe (III)
з матриці ХВПВ, залежно від часу
та виду екстрагенту**

Десорбція комплексу при інкубації ФХІ з водою відбувається більш інтенсивно, повне його вивільнення має місце після 210 хв екстрагування. Десорбція органічної форми Fe (III) при екстрагуванні розчинами, що відповідають рН відділам ШКТ, у перші 120 хв інкубації відбувається доволі повільно (всього 35%, на противагу експерименту з водою – 75%). Повне вивільнення комплексу має місце після 270 хв екстрагування. Повільну десорбцію комплексу при низьких значеннях рН середовища (перші 120 хв експерименту) можна пояснити низькою

водозв'язувальною здатністю ХВПВ за даних умов, що є певною перешкодою для вільного екстрагування комплексу. Повне вивільнення комплексу із матриці дозволяє припустити, що іммобілізація відбувається за рахунок фізичної сорбції. Час повної десорбції комплексу біометалу з матриці ХВПВ в обох експериментах відповідає уявленням щодо тривалості процесу транспортування харчової грудки із верхніх відділів ШКТ до місця поглинання біометалів ентероцитами тонкого кишечника. Закономірності десорбції комплексів Ca та Mg відповідають такій для комплексу Fe (III).

Отже, у даному розділі обґрунтовано наукові основи наноконструювання органічних комплексів біометалів, в яких низькомолекулярні продукти деструкції бактеріальних пептидогліканів та продукти метаболізму виконують роль змішанолігандних систем. Результати досліджень свідчать про ефективність застосування полідендантних змішанолігандних систем постбіотичного походження для комплексоутворення з біометалами, комплекси є рН та термостабільними, що створює передумови для їхнього ефективного використання у якості компонентів ДД та ФХІ.

У розділі 5 «Розробка технологій імуноотропних харчових інгредієнтів та дієтичних добавок на основі продуктів метаболізму та переробки пробіотичних культур» на основі узагальнення та аналізу літературних даних, результатів експериментальних досліджень, обґрунтовано технологію ряду ДД та ФХІ.

Технологічна схема виробництва ДД «Імунокорект» на основі низькомолекулярних продуктів деградації пептидогліканів клітинних стінок лактобацил представлена на рис. 14. У табл. 10. наведено витрати сировини на 100 кг продукту (з урахуванням втрат). Вимоги до якості ДД «Імунокорект» викладено в таблицях 11–12.

Таблиця 10

Витрати сировини на 100 кг продукту

Назва сировини	Норма витрати сировини
Біомаса, л	3030
Папаїн, кг	0,75
Лізоцим, г	0,32
МКЦ, кг	31

Таблиця 11

Фізико-хімічні показники ДД «Імунокорект»

Назва показника	Норма
Масова частка води, %, не більше	10,0
рН водної суспензії, од.	5,5–6
Амінокислоти, г/100 г	33,6
НМП, г/100 г	18,9
У т.ч. низькомолекулярні муропептиди г/100 г	13,2
Сторонні домішки	Не допускається

Таблиця 12

Органолептичні показники ДД «Імунокорект»

Назва показника	Характеристика показників
Зовнішній вигляд, консистенція	Однорідний сухий, тонкодисперсний сипучий порошок, з розміром часток 60 – 80 нм. Без сторонніх домішок. Допускається до 10% наявність грудочок, що легко розсипаються при натисканні
Колір	Білий, або світло-бежевий, властивий кольору компонентів, що входять до складу суміші згідно затвердженої рецептури. Допустима наявність відтінків.
Запах	Слабкий, властивий використовуваній сировини. Без стороннього запаху.

Фізіологічну активність та токсичність ДД «Імунокорект» досліджували *in vivo* на білих безпородних щурах. Встановлено, що за внутрішньошлункового введення, отриманий препарат відноситься до 4 класу токсичності – малотоксичні речовини (LD_{50} більше 10000 мг/кг маси тіла). Застосування ДД у дозах 12,5 та 25 мг/кг маси тіла спричинило вірогідне збільшення концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів та лейкоцитів. ДД у дозі 12,5 мг/кг маси тіла сприяє: у тимусі – збільшенню площі кіркової речовини за рахунок зростання кількості Т-лімфоцитів; у селезінці та лімфатичних вузлах – помірній гіперплазії лімфатичних вузликів і формуванню нових реактивних центрів, що вказує на імуностимулювальну дію препарату, стимулює підвищення активності клітин перитонеального ексудату білих щурів.



Рис. 14. Технологічна схема виробництва
ДД «Імунокорект»

Технологічну схему виробництва ДД «Вітапостум^{Fe}» на основі органічної форми феруму представлено на рис. 15. У табл. 13 наведено витрати сировини на 100 кг продукту (з урахуванням втрат). Вимоги до якості ДД «Вітапостум^{Fe}» викладено в таблицях 14–15.

Таблиця 13

Витрати сировини на 100 кг продукту (з урахуванням втрат)

Назва сировини	Норма витрати сировини
Біомаса, л	3030
Папайн, кг	0,75
Лізоцим, кг	0,32
Молочна кислота, кг	6,0
FeCl ₃ , кг	3,1
МКЦ, кг	27,3

Таблиця 14

Органолептичні показники ДД «Вітапостум^{Fe}»

Показник	Характеристика показників
Зовнішній вигляд, консистенція	Однорідний сухий, тонкодисперсний сипучий порошок, з розміром часток 60 – 80 нм. Без сторонніх домішок. Допускається до 10% наявність грудочок, що легко розсипаються при натисканні
Колір	Кремовий або світло-бежевий, або світло-жовтий, властивий кольору компонентів, що входять до складу суміші згідно затвердженої рецептури. Допустима наявність відтінків.
Запах	Слабкий, властивий використовуваній сировини, згідно затвердженої рецептури. Без стороннього запаху

Таблиця 15

Фізико-хімічні показники ДД «Вітапостум^{Fe}»

Назва показника	Норма
Масова частка вологи, %, не більше	10,0
pH водної суспензії, од.	5,0–5,5
Амінокислоти, г/100 г	39,6
НМП, г/100 г	18,9
У т.ч. низькомолекулярні муропептиди г/100 г	13,2
Fe ³⁺ , г/100 г	3,1
Сторонні домішки	Не допускається

Проведено комплексні токсикологічні дослідження безпечності та ефективності застосування ДД «Вітапостум^{Fe}» в експериментах на тваринах (безпородні білі шурі). Моделювання залізодефіцитної анемії проводили шляхом введення препарату «Десферал». Уведення в організм лабораторних тварин препарату «Десферал» із одночасним надходженням сполук змішанолігандного комплексу Fe (III) запобігало розвитку залізодефіцитних станів і показало ефективність застосування даного залізовмісного препарату як протианемічного, антиоксидантного та антигіпоксантичного засобу при профілактиці і лікуванні зазначених патологічних станів, пов'язаних з дефіцитом заліза в організмі.

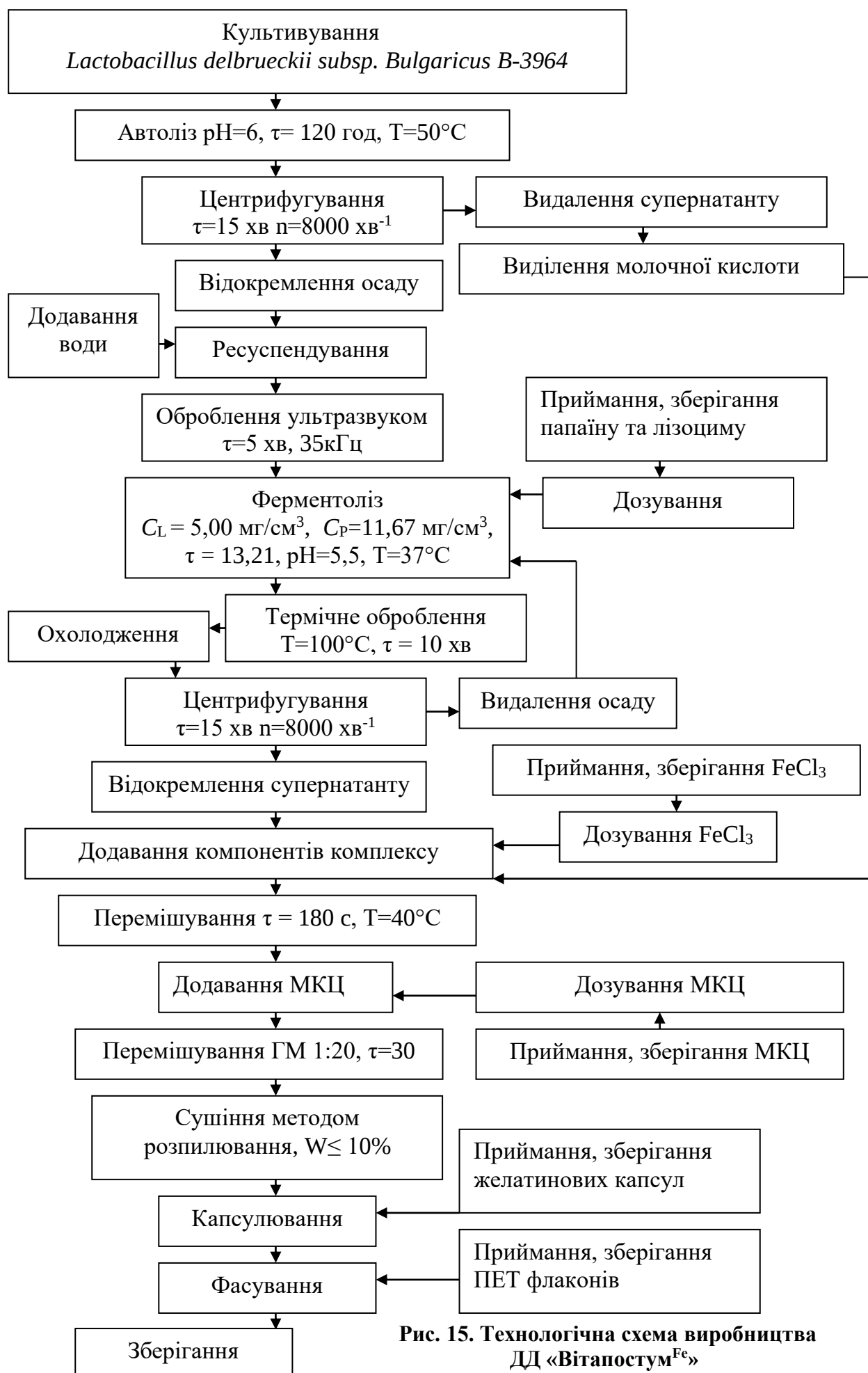


Рис. 15. Технологічна схема виробництва
ДД «Вітапостум^{Fe}»

Обґрунтовано технологію отримання ФХІ «Імунокорект*інгредієнт» на основі низькомолекулярних продуктів деградації пептидолгдіканів клітинних стінок лактобацил для харчових систем (ХС) з рівнем $a_w = 0,8-1$ (високий вміст води у складі ХС) та $a_w = 0,3-0,7$ (низький та середній вміст води у складі ХС). Технологічну схему виробництва ФХІ «Імунокорект*інгредієнт» представлено на рис. 16 У табл. 16 наведено витрати сировини на 100 кг продукту (з урахуванням втрат), у табл. 17–18 – якісні характеристики.

Таблиця 16

Витрати сировини для ФХІ «Імунокорект* інгредієнт»
для ХС з $a_w = 0,8-1$ / на 100 л **для ХС з $a_w = 0,3-0,7$ / на 100 кг**

Назва сировини	Норма витрати сировини	Назва сировини	Норма витрати сировини
Біомаса, л	101	Біомаса, л	175
Папаїн, г	25	Папаїн, г	30
Лізоцим, г	12	Лізоцим, г	14
Янтарна кислота, кг	1,0	ХВПВ, кг	96,5

Таблиця 17

Органолептичні показники ФХІ «Імунокорект* інгредієнт»

Назва показника	Характеристика показників	
	для ХС з $a_w = 0,8-1$	для ХС з $a_w = 0,3-0,7$
Зовнішній вигляд, консистенція	Однорідна рідина, без включень та розшарування. Допускається невеликий осад	Однорідний сухий, тонкодисперсний сипучий порошок, з розміром часток 60 – 80 нм. Без сторонніх домішок
Колір	Кремовий або світло-бежевий, властивий кольору компонентів, що входять до складу суміші згідно затвердженої рецептури. Допустима наявність відтінків.	
Запах	Слабкий, властивий використаній сировини, згідно затвердженої рецептури. Без стороннього запаху.	

Таблиця 18

Фізико-хімічні показники ФХІ «Імунокорект*інгредієнт»

Назва показника	Норма	
	для ХС з $a_w = 0,3-0,7$	для ХС з $a_w = 0,8-1,0$
Масова частка води, %, не більше	10,0	-
Масова частка сухих речовин, %, не більше	-	7,2
рН водної суспензії, од.	-	4,2–4,5
Амінокислоти, г/100 г; г/100 мл	2,34	1,33
НМП, г/100 г; г/100 мл	1,25	0,63
У т.ч. НММП г/100 г; г/100 мл	0,72	0,44
Сторонні домішки	Не допускається	Не допускається

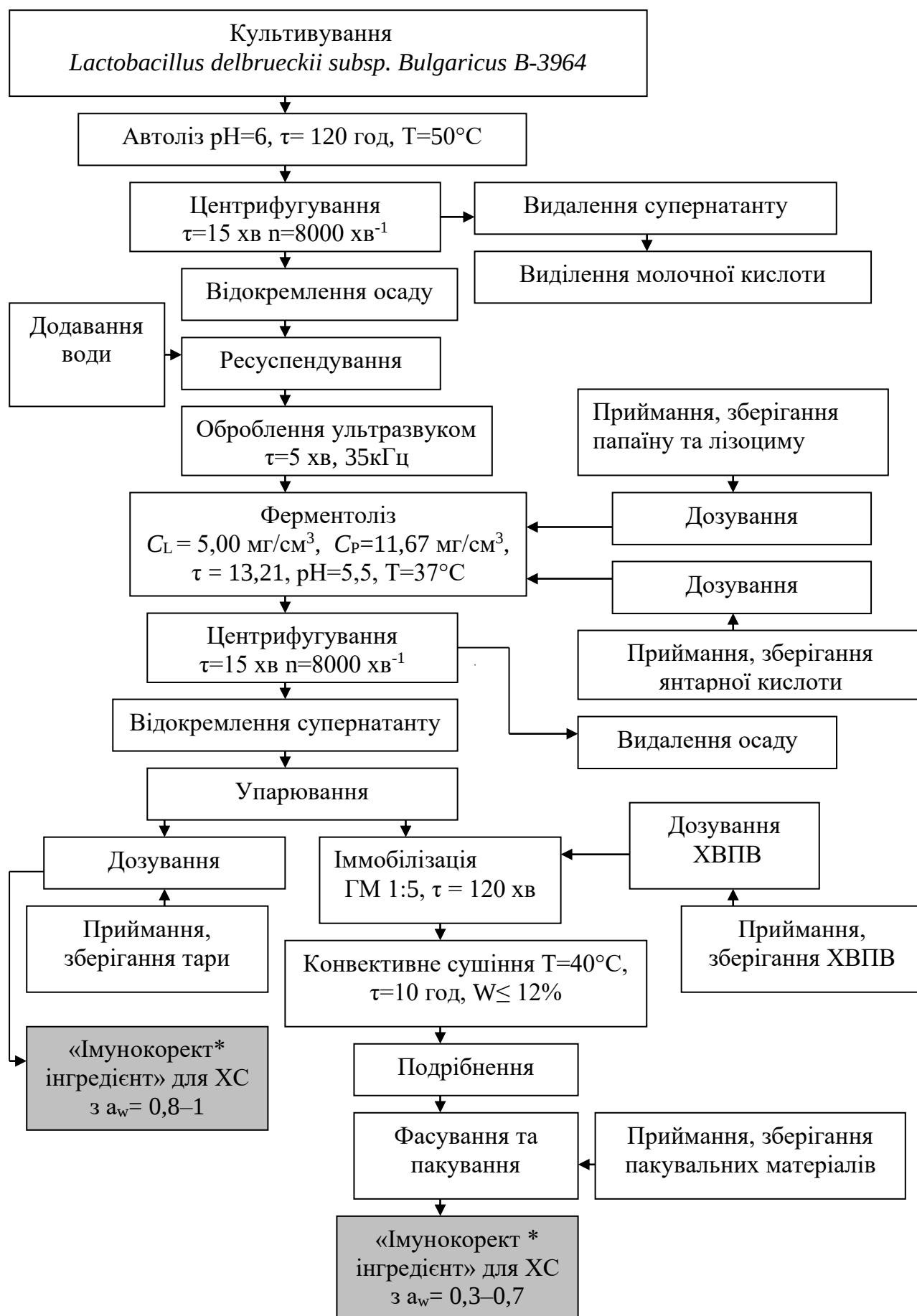


Рис. 16. Технологічна схема виробництва ФХІ «Імунокорект*інгредієнт»

Обґрунтовано технологію отримання ФХІ «Вітапостум^{Fe*}інгредієнт» на основі комплексу фери-іонів з низькомолекулярними продуктами деградації пептидолгдіканів клітинних стінок лактобацил та їхніми метаболітами, а саме молочною кислотою, для харчових систем (ХС) з рівнем $a_w = 0,8-1$ (високий вміст вологи у складі ХС) та $a_w = 0,3-0,7$ (низький та середній вміст вологи у складі ХС). Технологічну схему виробництва ФХІ Вітапостум^{Fe*}інгредієнт» представлено на рис. 17. У табл. 19 наведено витрати сировини на 100 кг продукту (з урахуванням втрат), у табл. 20–21 – якісні характеристики.

Таблиця 19

Витрати сировини для ФХІ «Вітапостум^{Fe*}інгредієнт»
для ХС з $a_w = 0,8-1$ / на 100 л **для ХС з $a_w = 0,3-0,7$ / на 100 кг**

Назва сировини	Норма витрати сировини	Назва сировини	Норма витрати сировини
Біомаса, л	101,0	Біомаса, л	4,0
Папаїн, г	25	Папаїн, г	1,0
Лізоцим, г	12	Лізоцим, г	0,45
Молочна кислота, кг	2,0	Молочна кислота, кг	0,08
FeCl ₃ , кг	5,4	FeCl ₃ , г	225,0
		ХВПВ, кг	97,5

Таблиця 20

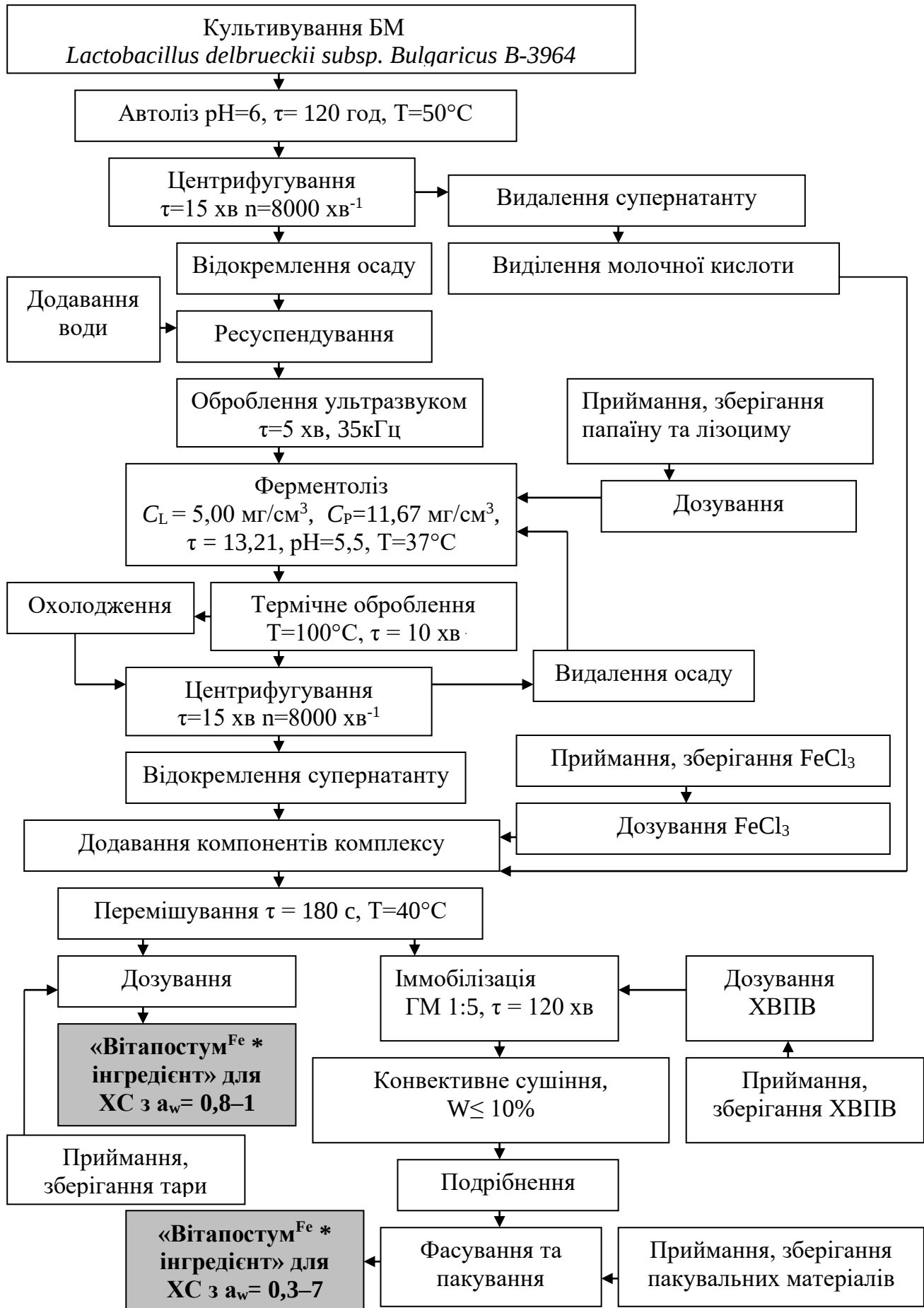
Органолептичні показники ФХІ «Вітапостум^{Fe*}інгредієнт»

Назва показника	Характеристика показників	
	для ХС з $a_w = 0,8-1$	для ХС з $a_w = 0,3-0,7$
Зовнішній вигляд, консистенція	Однорідна рідина, без включень та розшарування. Допускається невеликий осад	Однорідний сухий, тонкодисперсний сипучий порошок, з розміром часток 60 – 80 нм. Без сторонніх домішок
Колір	Кремовий або світло-бежевий, властивий кольору компонентів, що входять до складу суміші згідно затвердженої рецептури. Допустима наявність відтінків.	
Запах	Слабкий, властивий використаній сировини, згідно затвердженої рецептури. Без стороннього запаху.	

Таблиця 21

Фізико-хімічні показники ФХІ «Вітапостум^{Fe*}інгредієнт»

Назва показника	Норма	
	для ХС з $a_w = 0,3-0,7$	для ХС з $a_w = 0,8-1,0$
Масова частка вологи, %, не більше	10,0	-
Масова частка сухих речовин, %, не більше	-	7,4
pH водної суспензії, од.	-	4,2–4,5
Амінокислоти, мг/100 г; г/100 мл	52,8	1,33
НМП, мг/100 г; г/100 мл	25,1	0,63
У т.ч. НММП мг/100 г; г/100 мл	17,4	0,44
Fe ³⁺ , г/100 г; г/100 мл	72,0	1,7

Рис. 17. Технологічна схема виробництва ФХІ «Вітапостум^{Fe}*інгредієнт»

Розраховано собівартість та надано рекомендації до вживання та дозування розроблених ДД та ФХІ згідно визначених у медико-біологічних дослідженнях ефективних доз цільових імунотропних компонентів та органічних форм біометалів (табл. 22). Рекомендації корелюють з нормативно-правовими документами, а саме, Постановою Кабінету міністрів України № 780 від 11.10.2016 р. «Про затвердження наборів продуктів харчування, наборів непродовольчих товарів та наборів послуг для основних соціальних і демографічних груп населення» та Наказом № 1073 від 03.09.2017 «Про затвердження Норм фізіологічних потреб населення України в основних харчових речовинах і енергії».

Таблиця 22

Собівартість, рекомендації до вживання та дозування розроблених ДД та ФХІ

Назва продукту	Вартість продукту	Рекомендації до вживання та дозування
ДД «Імунокорект»	324 грн / 1 флакон (30 капсул)	Для нутритивної підтримки населення, що страждає на гіпофункцію імунної системи. Дозування: 1 капсула на добу
ДД «Вітапостум ^{Fe} »	336 грн / 1 флакон (30 капсул)	Для нутритивної підтримки населення, що страждає на гіпофункцію імунної системи. Дозування: 1 капсула на добу
ФХІ «Імунокорект* інгредієнт» для ХС з $a_w = 0,8-1$	320 грн / 1 л	Рекомендовано для функціональних напоїв типу соки, смузі. Дозування: 30 мл ФХІ на 1 л напою
ФХІ «Імунокорект* інгредієнт» для ХС з $a_w = 0,3-7$	450 грн / 1 кг	Рекомендовано для хлібобулочних виробів функціонального призначення, виготовлених безопарним способом. Дозування: 30 г ФХІ на 970 г борошна
ФХІ «Вітапостум ^{Fe} * інгредієнт» для ХС з $a_w = 0,8-1$	350 грн / 1 л	Рекомендовано для функціональних напоїв типу соки, смузі. Дозування: 0,8 мл ФХІ на 1 л напою
ФХІ «Вітапостум ^{Fe} * інгредієнт» для ХС з $a_w = 0,3-7$	150 грн / 1 кг	Рекомендовано для хлібобулочних виробів функціонального призначення, виготовлених безопарним способом. Дозування: 30 г ФХІ на 970 г борошна

Таким чином, у даному розділі обґрунтовано наукові основи виробництва імунокоригувальних харчових інгредієнтів та дієтичних добавок на основі низькомолекулярних продуктів деструкції бактеріальних пептидогліканів та органічних форм біометалів.

Проведені медико-біологічні дослідження довели фізіологічну активність отриманих МДП та органічної форми феруму, що дозволяє віднести їх до категорії перспективних харчових засобів імунотропної дії. Відповідно це є передумовою для удосконалення класифікації функціональних інгредієнтів за фізіологічною спрямованістю, а саме введення мулопептидів до категорії імунотропних ФХІ.

У шостому розділі «Удосконалення технологій функціональних продуктів харчування для населення зі зниженим імунним статусом» наведено експериментальні дослідження з обґрунтування режимів та кількості внесення розроблених ФХІ до продуктів харчування.

В основу розробки рецептур продуктів харчування покладено принципи функціональної спрямованості сировини, смакової сумісності рецептурних компонентів, збереження функціональних інгредієнтів протягом зберігання готового виробу та враховано ефективну добову дозу цільових функціонально-фізіологічних компонентів.

Для обґрунтування рецептури хліба функціонального призначення з вмістом ФХІ «Вітапостум^{Са*}інгредієнт» для ХС з $a_w = 0,3-0,7$ готували чотири зразки: контрольний, із заміною 1%, 3% та 5 % борошна на ФХІ (табл. 23). Фізико-хімічні характеристики готових виробів наведено в табл. 24, сенсорні – на рис. 18.

Таблиця 23

Рецептурні компоненти хліба функціонального призначення

Найменування сировини	Витрати компонентів рецептури, г			
	Контроль	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Борошно пшеничне І гатунку	1120,0	1108,0	1086,0	1064,0
ФХІ	–	12,0	34,0	56,0
Дріжджова суспензія (дріжджі пресовані*)	90,0 (30,0*)	90,0 (30,0*)	90,0 (30,0*)	90,0 (30,0*)
Розчин солі (сіль*)	58,0 (15,0*)	58,0 (15,0*)	58,0 (15,0*)	58,0 (15,0*)
Вода	501,0	501,0	501,0	501,0
Разом (тіста)	1769,0	1769,0	1769,0	1769,0
Вологість тіста, %	44,5	44,5	44,5	44,5
Температура початкова, °С	29-31			
Тривалість бродіння, хв	170-190			
Кислотність кінцева, град	3,5-4,0			
Підймальна сила, хв	15-18			

Таблиця 24

Фізико-хімічні показники дослідних зразків хліба

Показник	Зразок №1	Зразок №2	Зразок №3	ДСТУ 7517:2014
Об'єм хліба, см ³	770	840	700	Не нормується
Питомий об'єм, см ³ /100 г	408	381	373	Не нормується
Формостійкість, Н/Д	0,5	0,41	0,33	Не нормується
Пористість, %	65	63	60,5	Не $\leq 63,0$
Вологість, %	44,3	44,6	44,3	Не $\geq$ ніж 39,0–48,0
Кислотність, град	2,2	2,2	2,2	Не $\geq$ ніж 2,5–5,0

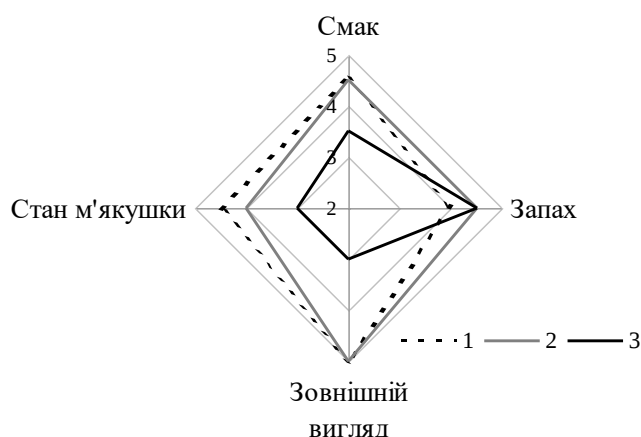


Рис. 18. Сенсорні характеристики дослідних зразків

Проведені дослідження дозволили обґрунтувати технологічну схему виробництва хліба функціонального призначення з вмістом хелатних форм кальцію (форма – подова, вага 500 г). При вживанні 280 г хліба функціонального, покривається 98% кальцію (розраховано на 40% від деної норми) та забезпечується 7,2% від добової потреби у харчових волокнах.

Також у даному розділі наведено дослідження щодо розроблення рецептури функціонального напою на основі апельсинового пюре та ФХІ «Імунокорект*інгредієнт» для ХС $a_w=0,8-1$. У ході роботи розроблено та апробовано 10 рецептур, із них відібрано 3 прийнятних, які представлено у таблиці 25.

Надано органолептичну оцінку відібраних напоїв, середню балову оцінку учасників дегустації представлено на рис. 19.

Таблиця 25

Рецептура функціональних напоїв

Сировина	Вміст компонентів, %		
	№ 1	№ 2	№ 3
Апельсиновий концентрат	39,2	39,2	39,2
Вода	47,6	39,6	47,8
Цукор	12,1	19,8	11,9
Лимонна кислота	0,8	0,8	0,8
ФХІ	0,3	0,6	0,3
Всього	100	100	100

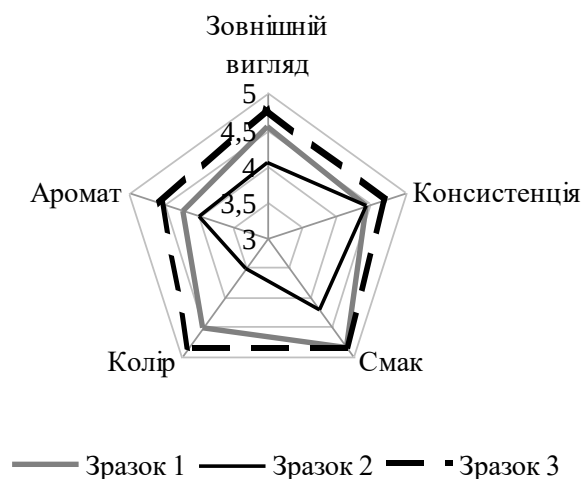


Рис. 19. Профілограма сенсорної оцінки зразків функціональних апельсинових напоїв

За підсумками органолептичної оцінки, зразки № 1 і № 3 отримали однаково високі бали за смакові якості – 4,84, проте зразок № 3 визнано найкращим,

отримавши вищу оцінку за зовнішній вигляд, колір і аромат – 4,77; 4,87 і 4,52 балів відповідно, а також найвищий середній бал – 4,75.

У табл. 26 надано характеристику напоїв за фізико-хімічними показниками.

Таблиця 26

Фізико-хімічні характеристики розроблених напоїв

№	Показник	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	За ДСТУ 7159:2010
1	Розчинні сухі речовини, %	8,5	11,8	11,4	Не менше 11,2
2	Титровані кислоти в перерахунку на лимонну кислоту, %	0,24	0,38	0,34	Не менше 0,3
3	Масова частка м'якоті, %	1,0	6,0	5,0	Н більше 25
4	pH	4,2	3,9	4,1	Не нормується
5	Мінеральні домішки	не виявлено	не виявлено	не виявлено	Не більше 10
6	Оксиметилфурфурол, мг/дм ³	не виявлено	не виявлено	не виявлено	Не дозволено

Дані таблиці 26 свідчать, що вимогам ДСТУ 7159:2010 повністю відповідає зразок 3. Незначний вміст м'якоті у складі всіх дослідних зразків пояснюється дрібною дисперсністю вихідного апельсинового пюре, на основі якого їх готували. Результати фізико-хімічних досліджень корелюють з сенсорною оцінкою зразків і дозволяють виділити найкращий зразок апельсинового функціонального напою для подальшої його актуалізації шляхом розроблення нормативної документації та впровадження у виробництво.

У цілому, у даному розділі удосконалено технології функціональних харчових продуктів з вмістом імунокоригувальних харчових інгредієнтів та дієтичних добавок на основі низькомолекулярних продуктів деструкції бактеріальних пептидогліканів та органічних форм біометалів, розроблено технологічні режими їхнього отримання, нормативну документацію для впровадження у виробництво, плани НАССР та ОПП.

ВИСНОВКИ

Науково обґрунтовано та розроблено технології імунотропних функціональних інгредієнтів, дієтичних добавок та продуктів харчування на основі сполук бактеріального походження, які є об'єктами для розпізнавання рецепторами імунної системи, та наноконструйованих на їхній основі хелатних структур есенціальних біометалів.

1. Обґрунтовано доцільність використання муропептидів у якості імунотропних харчових інгредієнтів та компонентів дієтичних добавок для нутритивної підтримки населення, що страждає на розлади функціонування імунної системи. Для отримання імунотропних пептидів доцільним є використання пробіотичних бактерій, оскільки вони мають статус безпечних мікробіальних об'єктів, що є передумовою для їхнього використання у складі харчових систем.

2. На основі скринінгу пробіотичних культур встановлено відповідність *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* B-3964 критеріям, що визначають придатність бактеріального об'єкту для його використання як джерела отримання МП: наявність у структурі пептидоглікану клітинної стінки фрагментів, спроможних активізувати NOD 1 та NOD 2 рецептори, здатність до дезінтеграції та ферментативної деструкції.
3. Розроблено методологію деструкції пептидогліканів (ПГ) пробіотичних бактеріальних клітин що передбачає використання ендогенного ензиматичного потенціалу (автолізинів), фізичних факторів впливу (випромінювання НВЧ та обробку УЗ), ферментолізу за участю протеаз різного походження та мурамідаз, комбінованих методів фрагментації ПГ. Раціональними режимами автолізу є: рН 6, температура 50°C, час 120 год; ультравукової обробки: 300 с, 35 кГц. Методом математичного моделювання багатфакторних експериментів визначено раціональні режими ферментативного гідролізу автолізату біомаси за участю лізоциму та папаїну, що забезпечують максимальне накопичення низькомолекулярних муропептидів. $C_L = 5,00 \text{ мг/см}^3$, $C_P = 11,67 \text{ мг/см}^3$, $\tau = 13,21$, $pH = 5,5$, $T = 37^\circ\text{C}$.
4. Здійснено ідентифікацію та характеристику низькомолекулярних муропептидів. Доведено, що у складі гідролізатів пептидогліканів *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* B-3964 за визначеними умовами накопичується $6,58 \text{ мг/см}^3$ низькомолекулярних пептидів, у тому числі, $4,35 \text{ мг/см}^3$ НММП з молекулярною масою в діапазоні 300–700 Да. В отриманих речовинах встановлено наявність специфічних груп та хімічних зв'язків, характерних для первинної структури ПГ, показано відсутність хімічної модифікації функціональних груп НММП при використанні сукупності запропонованих прийомів обробки мікробіальної сировини, що є однією з передумов безпечності отриманих пептидів.
5. Розроблено методологію щодо отримання комплексів біометалів з біолігандами бактеріального походження, які містять метал у безпечній органічній (хелатній) формі, є стійкими у широкому діапазоні рН середовищ та температур. Доведено ефективність застосування полідендантних змішанолігандних систем пробіотичного походження для комплексоутворення з біометалами; сполучення комплексів з біополімерною матрицею сприяє розширенню спектру фізіологічної дії композиції що дозволяє віднести дані засоби до категорії поліфункціональних.
6. Розроблено технології імуноотропних дієтичних добавок «Імунокорект» та «Вітапостум^{Fe}», функціональних харчових інгредієнтів «Імунокорект*інгредієнт» та «Вітапостум^{Fe}*інгредієнт» на основі низькомолекулярних продуктів деструкції бактеріальних пептидогліканів та органічних комплексів есенціальних біометалів, наведено технологічні режими їхнього отримання та розроблено нормативну документацію для впровадження у виробництво, включаючи технічні умови, технологічні інструкції та процедури, засновані на принципах НАССР.

7. Доведено біологічну активність розроблених добавок та інгредієнтів *in vivo*, визначено їхню токсичність та ефективну дозу. Встановлено, дієтична добавка «Імунокорект», відноситься до 4 класу токсичності – малотоксичні речовини (LD_{50} більше 10000 мг/кг маси тіла), а її ефективна доза складає 12,5 мг/кг маси тіла. Доведено дієвість залізовмісного препарату як протианемічного, антиоксидантного та антигіпоксикантного засобу із розрахунку добової дози феруму 15 мг.
8. Запропоновано удосконалення існуючої класифікації функціональних харчових інгредієнтів за напрямом їхньої фізіологічної дії, а саме, включення до категорії імунотропних речовин (вітамінно-мінеральних комплексів, поліненасичених жирних кислот та пробіотиків), сполук постбіотичного походження направленої імунотропної дії – муропептидів.
9. Обґрунтовано технології харчових продуктів з вмістом розроблених функціональних харчових інгредієнтів: пшеничного хліба та апельсинового напою. Надано рекомендації щодо особливостей внесення розроблених імунотропних харчових інгредієнтів у певні харчові системи з різним значенням показника активності води (a_w). Встановлено, що внесення функціональних харчових інгредієнтів, не приводить до погіршення фізико-хімічних показників досліджуваних харчових продуктів, вони знаходяться в межах, затверджених нормативною документацією.
10. Розроблено нормативну документацію (ТУ, ТІ) на технології імунокоригувальних харчових інгредієнтів «Імунокорект*інгредієнт» та «Вітапостум^{Fe}*інгредієнт» для харчових систем з $a_w = 0,8-1$ та $a_w = 0,3-7$, дієтичних добавок «Імунокорект» та «Вітапостум^{Fe}» на основі низькомолекулярних продуктів деструкції бактеріальних пептидогліканів та органічних форм біометалів. Проведено промислову апробацію розроблених технологій на науково-виробничому біотехнологічному підприємстві «Аріадна», м. Одеса. Розраховано собівартість та економічних ефект від впровадження розроблених технологій. Розроблені у роботі методики визначення муропептидів у складі бактеріальних гідролізатів та визначення комплексоутворювальної ємності змішанолігандних органічних систем відносно іонів металів впроваджено у навчальний процес при виконанні магістерських робіт, у лабораторний практикум курсів «Експертиза харчових продуктів», «Харчова хімія».

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України, що цитуються у
наукометричних базах Scopus та Web of Science

1. Капустян А.І., Черно Н.К. Chelate forms of biometalls. Theoretical aspects of obtaining and characteristics // Харчова наука і технологія. 2017. Т. 11, Вип. 1, Одеса. С. 37-49. (*Web of Science*)
2. Determination of the enzyme destruction rational mode of biomass autolysate of lactic acid bacteria / A. Kapustian et al. // Eastern-European Journal of Enterprise

- Technologies. 2018. 1/11 (91). P. 63-68. DOI: 10.15587/1729-4061.2018.120877. (*Scopus*)
3. Kapustian A., Chernon N., Kolomiets I. Obtaining and characteristic of muropeptides of probiotic cultures cell walls // Food science and technology. 2018. Vol. 12, Issue 1. P. 10-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v12i1.885>. (*Web of Science*)
 4. Kapustian A., Chernon N., Nikulina O. Obtaining and characteristics of calcium organic forms on the basis of metabolites and processing products of probiotic bacteria // Food science and technology. 2018. Vol. 12, Issue 2. P. 4-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v12i2.944>. (*Web of Science*)
 5. Kapustian A., Antipina O., Budiak R. Obtaining and characteristic of the magnesium organic forms on the basis of products of bifidobacteria processing and their metabolites // Food science and technology. 2018. Vol. 13, Issue 3. P. 4-12. <https://doi.org/10.15673/fst.v12i3.1054>. (*Web of Science*)
 6. Kapustyan A., Stankevych G., Chernon N. Rational modes definition of the obtaining of low molecular weight peptides from the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* peptidoglycans // Food science and technology. 2020. Vol. 14, Issue 1. P. 22-31 DOI: <https://doi.org/10.15673/fst.v14i1.1661>. (*Web of Science*)
 7. Kapustian A., Chernon N. Investigation of the ferric ions complexes with biolygands of probiotic origin // Ukrainian Food Journal. 2020. Volume9. Issue 1. P 47-59. DOI: 10.24263/2304-974X-2020-9-1-5. (*Web of Science*)

Статті у фахових виданнях України

8. Капустян А.І., Черно Н.К., Сейрик В.В. Отримання та характеристика біологічно активного гідролізату *Lactobacillus acidophilus*. Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. 2013. Т. 2, Вип. 44. С. 95-99.
9. Черно Н.К., Капустян А.І. Перспективи використання біологічно активних бактеріальних гідролізатів для нутритивної підтримки населення з розладами імунної системи // Харчова наука і технологія 2015. №2(31). С. 18-25.
10. Капустян А.І. Характеристика імунотропних функціональних інгредієнтів, отриманих шляхом фізичного впливу // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького. 2017. Т. 19, № 75. С. 13-18.
11. Капустян А.І., Черно Н.К. Комбінований метод дезінтеграції мікробіальної біомаси // Наукові праці / ОНАХТ. Одеса. 2017. Т. 81, вип. 2. С. 4-11.
12. Капустян А.І. Дослідження лізису клітин молочнокислих бактерій під дією протеолітичних ферментів // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі. 2018. Вип. 1(27). С. 168-178.
13. Капустян А.І., Черно Н.К. Отримання та характеристика продуктів деструкції пептидоглікану *Lactobacillus acidophilus* К 3111 // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького. 2018. Т. 20., Вип. 85. С. 141-147. doi: 10.15421/nvlvet8526<http://nvlvet.com.ua/>

14. Капустян А.І., Черно Н.К. Дієтична добавка імуноотропної дії на основі продуктів деструкції пробіотичних бактеріальних культур // Наукові праці / ОНАХТ. Одеса, 2018. Т. 82, вип. 1. С. 108-115. <http://dx.doi.org/10.15673/swonaft.v82i1.1016>
15. Капустян А.І., Черно Н.К. Визначення комплексоутворювальної здатності змішанолігандних органічних систем по відношенню до йонів металів // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького. 2019. Т. 21. № 91 С. 130-135.
16. Капустян А.І., Черно Н.К., Пукас А.С. Розроблення методу визначення функціональних харчових інгредієнтів муропептидного походження у бактеріальних дезінтегратах // Наукові праці НУХТ. 2019. Том 25, Вип. 6. С. 156-163
17. Капустян А., Черно Н., Науменко К. Функціональний апельсиновий напій із вмістом імуноотропних інгредієнтів бактеріального походження. Наукові праці ОНАХТ. 2019. 83(2). С. 19-25. <https://doi.org/10.15673/swonaft.v2i83.1533>
18. Kapustian A., Chernon, N. Lebedenko T. Functional wheat bread with calcium chelate complexes. Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Food Technologies. 2020. V. 22(93). 31-38. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-f9306>
19. Капустян А.І., Черно Н.К. Поліфункціональні харчові інгредієнти на основі комплексів біометалів зі сполуками пробіотичного походження // Наукові праці НУХТ. 2020. Том 26, Вип. 2. С. 201-211.

Статті у іноземних виданнях

20. Kapustian A., Chernon N. Obtaining and characteristic of the autolysate of lactic acid bacteria // EUREKA: Life Sciences. 2018. № 1. Р. 24-31. DOI: 10.21303/2504-5695.2018.005583. *Стаття у виданні Естонської республіки, що цитується у міжнародних наукометричних базах*
21. Products of Metabolism and Processing of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Functional Ingredients / A. Kapustian et al. // Food Science and Applied Biotechnology. 2018. 1(1). Р. 54-62 <https://doi.org/10.30721/fsab2018.v1.i1>. *Стаття у виданні республіки Болгарія, що цитується у міжнародних наукометричних базах*

Статті у наукових виданнях України

22. Капустян А.І., Черно Н.К. Immunological properties of the bacterial origin compounds // Харчова наука і технологія 2016. Т. 10, Вип. 3, Одеса. С. 18-25. (Web of Science)

Патенти України

23. Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок бактерій: Патент на корисну модель № 100637 Україна: МПК (2011.01) C12N 11/00 / Капустян А.І., Черно Н.К.; власник ОНАХТ. заявл. 29.09.2014; опубл. 10.08.2015 Бюл. № 15, 2015.
24. Спосіб визначення комплексоутворювальної ємності змішанолігандних органічних систем відносно іонів металів: Патент на корисну модель

- № 138829 Україна: МПК C12N 3/00, C07C 229/76 / Капустян А.І., Черно Н.К.; власник ОНАХТ. No u201905604 опубл. 10.12.2019, бюл. № 23/2019.
25. Спосіб одержання глікопептидного продукту із клітинних стінок пробіотичних бактерій: Патент на корисну модель № 138938 Україна: МПК A61K 36/00, A61K 31/198/ Капустян А.І., Черно Н.К. Бурдо О.Г.; власник ОНАХТ. No u201906161 опубл. 10.12.2019, бюл. № 23/2019.
26. Дієтична добавка «Імунокорект» Патент на корисну модель № 141840 Україна: МПК A61K 35/741/ Капустян А.І., Черно Н.К., Пукас А.С.; власник ОНАХТ. No u201910893 опубл. 27.04.2020, бюл. № 8/2020.
27. Спосіб визначення муропептидів у складі бактеріальних гідролізатів. Патент на корисну модель 142457 Україна: МПК G01N 31/00/ Капустян А.І., Черно Н.К., Озоліна С.О.; власник ОНАХТ. No u201910888 опубл. 10.06.2020.
28. Дієтична добавка "Імунокорект". Патент України № 122754 Україна: МПК A61K 35/741 (2015.01), A61K 38/14 (2006.01), A61P 37/02 (2006.01)/ Капустян А.І., Черно Н.К., Пукас А.С.; власник ОНАХТ. No a201910894 опубл. 28.12.2020, бюл. № 24/2020

Монографія

29. Капустян А.І., Черно Н.К., Коваленко В.О. Муропептиди у функціональному харчуванні : монографія. Херсон : Олді-плюс. 2020. 183 с.

Тези та матеріали аукових конференцій

30. Черно Н.К., Капустян А.І., Сейрик В.В. Гидролиз молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* композицией гидролитических ферментов // Сучасний ринок товарів та проблеми здорового харчування: мат. Міжнародної: науково-практичної інтернет-конференції, Харків, 13-14 травня 2013 р. / Харківський держ. ун-т харчування і торгівлі. Харків, 2013. С. 119-120.
31. Капустян А.І., Силенко М.С. Изучение стабильности иммобилизованных пищеварительных ферментов в присутствии ионов тяжелых металлов // Харчові добавки. Харчування здорової і хворої людини: мат. VI Міжгалузевій міжнародній науково-практичній конференції, Донецьк, 2013 / Донецький національний ун-т економіки і торгівлі. – Донецьк, 2013. С. 206-207.
32. Капустян А.І. Получение и характеристика иммобилизованных форм продуктов ферментализации клеточных стенок бактерий *L. Acidophilus*. *Nastolení moderní vědy – 2014: Materiály X mezinárodní vědecko-praktická konference Díl 10. Lékařství. Biologické vědy*, Praha, 2014 / Publishing House «Education and Science» s.r.o -80 stran. Praha, 2014. P. 68-72.
33. Черно Н.К., Капустян А.І., Шафран Л.М., Третьякова Е.В. Исследование активности иммобилизованных пищеварительных ферментов в присутствии контаминантов – ионов тяжелых металлов // Микроэлементы в медицине, ветеринарии, питании: перспективы сотрудничества и развития: материалы Межд. науч.-практ. конф., Одесса, 25-26 сентября 2014 г. / Украинский НИИ медицины транспорта. Одесса, 2014. С. 299-302.
34. Капустян А.І., Надточій Д.В. Поліфункціональний імуноотропний інгредієнт // Інноваційні технології розвитку у сфері харчових виробництв, готельно-

ресторан-ного бізнесу, економіки та підприємництва: наукові пошуки молоді: мат. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих учен. і студ., Харків, 26 берез. 2014 р. / ХДУХТ. Харків, 2014. – С. 139.

35. Капустян А.И., Силенко М.С. Получение и характеристика биополимерных иммунотропных комплексов // Проблеми формування здорового способу життя у молоді: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених та студентів з міжнародною участю, Одеса, 2014 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2014. С. 48-49.
36. Черно Н., Капустян А.И., Силенко М. Перспективи використання складових пептидогліканів для нутритивної підтримки верств населення з розладами імунної системи // Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Київ, 28-29 травня 2015 р. / Київський нац. ун-т харч. технологій. Київ, 2015. С. 1-2.
37. Черно Н.К., Капустян А.И., Силенко М.В. Отримання біологічно активних компонентів клітинних стінок полівидової бактеріальної закваски ферментативним способом // 75 наукова конференція викладачів Одеської національної академії харчових технологій: матеріали конференції, Одеса, квітень 2015 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2015. С. 92.
38. Черно Н., Капустян А.И., Черная А. Получение биологически активных компонентов клеточных стенок поливидовой бактериальной закваски ферментативным способом // Стан і перспективи харчової науки та промисловості: Міжнародна науково-технічна конференція: матеріали міжнародної науково-технічної конференції, Тернопіль 8-9 жовтня 2015 р. / Тернопільський нац. техн. ун-т ім. І. Пулюя. Тернопіль, 2015. С. 128-131.
39. Черно Н., Капустян А., Чорна А. Вплив деяких фізико-хімічних дезінтегруючих факторів на вихід біологічно активних фрагментів пептидогліканів клітинних стінок бактерій // 76 наукова конференція викладачів Одеської національної академії харчових технологій: матеріали конференції, Одеса, квітень 2016 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2016. С. 98-99.
40. Капустян А., Черно Н., Чорна А. Отримання комплексів кальцію з метаболітами та продуктами деградації клітинних стінок молочнокислих бактерій // Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, Київ, травень 2016 р. / Національний університет харчових технологій. Київ, 2016. С. 90-92.
41. Капустян А., Черно Н., Чорна А. Комбинированный метод получения иммунотропных компонентов пептидогликанов клеточных стенок бактерий // Розвиток харчових виробництв, ресторанного та готельного господарств і торгівлі: проблеми, перспективи, ефективність: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 19 травня 2016 р. / Харківський держ. ун-т харчування і торгівлі. Харків, 2016. С. 189-190.

42. Капустян А.І., Черно Н.К. Порівняльна характеристика дезінтегратів *Lactobacillus acidophilus*, отриманих шляхом фізичного впливу // Харчові технології, хлібопродукти і комбікорми: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Одеса, 13-17 вересня 2016 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2016. С. 109-110.
43. Капустян А.І., Черно Н.К. Автолітичні зміни біомаси *Lactobacillus acidophilus* як фактор поліпшення ефективності її ферментативної деструкції // Розвиток харчових виробництв, ресторанного та готельного господарств і торгівлі: проблеми, перспективи, ефективність: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 18 травня 2017 р. / Харківський держ. ун-т харчування і торгівлі. Харків, 2017. Ч. 1. С. 75-76.
44. Капустян А.І., Черно Н.К. The calcium complexes with metabolites and degradation products of the lactic acid bacteria cell walls // 77 наукова конференція викладачів Одеської національної академії харчових технологій: матеріали конференції, Одеса, квітень 2017 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2017. С. 124-126.
45. Черно Н.К., Гураль Л.С., Капустян А.І., Науменко К.І. Полісахариди – протектори біологічно активних речовин // Технології харчових продуктів і комбікормів: збірник тез доповідей Міжнар. наук.-практ. конференції, Одеса, 25-30 вересня 2017 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2017. С. 80-81.
46. Products of Metabolism and Processing of Lactic Acid Bacteria as Functional-physiological Ingredients/ Kapustian et al. // Харчова наука, техніка та технології – 2017: матеріали 64-ї міжнародної конференції, Пловдив, Болгарія, 24 жовтня 2017 р. / Ун-т харч. технологія. – Пловдив, Болгарія, 2017. С. 11-12.
47. Капустян А.І., Черно Н.К. Порівняльна характеристика фізичних, хімічних, ензиматичних та комбінованих методів дезінтеграції мікробіальної маси // 78 наукова конференція викладачів Одеської національної академії харчових технологій: матеріали конференції, Одеса, квітень 2018 р. / Одес. нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2018. С. 117-118.
48. Kapustian A.I., Chernov N.K. Methodological approaches to the destruction of probiotic bacteria peptidoglycan // Технології харчових продуктів і комбікормів: мат. Міжнародної науково-практичної конференції, Одеса, 24-29 вересня 2018 р. / Одеська нац. акад. харч. технологій. Одеса, 2018. С. 80-81.
49. Капустян А.І., Черно Н.К. Хелатні комплекси Ca^{2+} з метаболітами пробіотичних бактерій та муропептидами їхніх клітинних стінок // Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Київ, 14-15 листопада 2018 р. / Національний університет харчових технологій. Київ, 2018. С. 114-115.
50. Капустян А.І., Черно Н.К. Отримання муропептидів на основі пептидогліканів пробіотичних бактерій // Розвиток харчових виробництв, ресторанного та готельного господарств і торгівлі: проблеми, перспективи, ефективність: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 19 листопада 2018 р. / Харківський держ. ун-т харчування і торгівлі. Харків, 2018. Ч. 1. С. 135-137.

51. Капустян А.І., Черно Н.К., Пукас А.С. Комплекси магнію з продуктами метаболізму та переробки пробіотичних культур // 79 наукова конференція викладачів ОНАХТ технологій: матеріали конференції, Одеса, ОНАХТ, квітень 2019 р. С. 117-118.
52. Капустян А.І., Черно Н.К., Пукас А.С. Organic biometal complexes: an innovative approach to solving the identification problem // Технології харчових продуктів і комбікормів: мат. Міжнародної науково-практичної конференції, 24-27 вересня 2019 р. ОНАХТ, Одеса. С. 38-39.
53. Капустян А.І., Черно Н.К., Пукас А.С. Муропептиди – перспективні фізіологічно-функціональні харчові інгредієнти // Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції: Програма та тези матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції, 5-6 листопада 2019 р. м. Київ. К.: НУХТ. С. 25-26.
54. Капустян А.І., Науменко К. І. Черно Н. К. Функціональний апельсиновий напій // The 7th International scientific and practical conference “Perspectives of world science and education” (March 25-27, 2020) CPN Publishing Group, Osaka, Japan. 2020. P. 330-336.
55. Капустян А., Черно Н., Пислар Т. Функціональний харчовий інгредієнт на основі органічної форми феруму та харчових волокон // Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, Київ, 19-20 листопада 2020 р. / Національний університет харчових технологій. Київ, 2020. С. 16-17.

Особистий внесок здобувача у наукових роботах: критичний аналіз наукових вітчизняних та зарубіжних літературних джерел, патентний пошук; узагальнення теоретичної інформації, формулювання проблеми галузі та актуальності досліджень; систематизація завдань; розроблення порядку та методології досліджень; планування, проведення та керування експериментальними дослідженнями, узагальнення результатів, формулювання висновків; написання наукових робіт, патентів, та їхнє підготування до друку.

АНОТАЦІЯ

Капустян А. І. Наукові основи розробки технологій функціональних імунотропних інгредієнтів та харчових продуктів на основі сполук бактеріального походження. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій Міністерства освіти і науки України, Одеса, 2021.

Дисертаційну роботу присвячено науковому обґрунтуванню та розробленню технології імунотропних функціональних інгредієнтів, дієтичних добавок та продуктів харчування на основі сполук бактеріального походження, призначених для подолання проблеми порушення функції імунної системи людини шляхом корекції харчового статусу із застосування у раціонах харчування імунотропних компонентів мікробіального походження, які є

об'єктами для розпізнавання рецепторами імунної системи, та наноконструйованих на їхній основі хелатних структур есенціальних біометалів.

У дисертаційній роботі теоретично та експериментально обґрунтовано вибір об'єкту для отримання імунотропних пептидів, а саме, *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* В-3964, розроблено методологічні підходи до деструкції пептидогліканів бактеріальної сировини з метою отримання імунотропних мунопептидів, що передбачають використання потенціалу ендогенних автолізинів бактеріальної маси та екзогенних ферментних композицій із широким ареалом субстратної специфічності, залучення комбінованих методів ізоляції із застосуванням фізичних факторів впливу. Раціональними режимами автолізу є: рН 6, температура 50°C, час 120 год; ультравукової обробки: 300 с, 35 кГц; ферментолізу: $C_L = 5,00 \cdot 10^{-2}$ мг/см³, $C_P = 11,67 \cdot 10^{-2}$ мг/см³, $\tau = 13,21$ год, рН=5,5, $T=37^\circ\text{C}$. За визначених умов накопичується 6,58 мг/см³ низькомолекулярних пептидів, у тому числі, 4,35 мг/см³ НММП з молекулярною масою в діапазоні 300–700 Да.

У роботі обґрунтовано наукові основи отримання біодоступних форм есенціальних біометалів шляхом наноконструювання органічних комплексів біоелементів, в яких низькомолекулярні продукти деструкції бактеріальних пептидогліканів та продукти метаболізму виконують роль змішанолігандних систем. Доведено, що отримані форми металів мають хелатну структуру, є стійкими до дії агресивних значень рН середовищ та високих температур, що обумовлює перспективу їхнього використання у складі харчових систем, отримання яких передбачає високотемпературну обробку та стабільність до дії середовищ шлунково-кишкового тракту.

Обґрунтовано наукові основи технологій імунокоригувальних харчових інгредієнтів та дієтичних добавок на основі низькомолекулярних продуктів деструкції бактеріальних пептидогліканів та органічних комплексів есенціальних біометалів, наведено технологічні режими їхнього отримання та розроблено нормативну документацію для впровадження у виробництво, включаючи технічні умови, технологічні інструкції та процедури, що засновані на принципах НАССР.

Фізіологічну активність розроблених дієтичних добавок та функціональних харчових інгредієнтів доведено у дослідях *in vivo*, визначено їхню токсичність та ефективну дозу, згідно чого надано рекомендації щодо дозування для введення розроблених інгредієнтів у певні категорії харчових продуктів.

Обґрунтовано технології харчових продуктів з вмістом розроблених функціональних харчових інгредієнтів, розраховано собівартість продукції та економічну ефективність розроблених технологій.

Ключові слова: функціональне харчування, дієтична добавка, функціональний харчовий інгредієнт, технологія, пробіотики, постбіотики, пептидоглікан, мунопептиди, протеази, мурамідози, біометали.

ABSTRACT

Kapustyan A.I. Scientific bases of the technologies development of functional immunological ingredients and food products of on the basis of bacterial origin compounds. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation for the scientific degree of the doctor of technical sciences on a specialty 03.00.20 – biotechnology. – Odessa National Academy of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Odessa, 2021.

The dissertation is devoted to the scientific substantiation and development of technology of immunotropic functional ingredients, dietary supplements and food products based on compounds of bacterial origin, designed to overcome the problem of human immune system dysfunction by correcting the nutritional status with using immunotropic components of microbial origin as the objects for recognition by receptors of the immune system, and nanoconstructed on their basis chelated structures of essential biometals.

The dissertation theoretically and experimentally substantiates the choice of the object for obtaining immunotropic peptides, namely, *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* B-3964, which meets the criteria determining the suitability of the bacterial object as a source of muropeptides: the presence in the structure of the peptidoglycan cell wall fragments capable of activating NOD 1 and NOD 2 receptors, the ability to disintegrate and enzymatic destruction.

Methodological approaches have been developed to the destruction of peptidoglycans of bacterial raw materials in order to obtain immunotropic muropeptides, involving the use of the potential of endogenous autolysins of bacterial mass and exogenous enzyme compositions with a wide range of substrate specificity, involving combined methods of isolation factors using. Rational modes of autolysis are: pH 6, temperature 50°C, time 120 h; ultrasonic processing: 300 s, 35 kHz. Rational modes of enzymatic hydrolysis of biomass autolysate with the participation of lysozyme and papain, which provide maximum accumulation of low molecular weight muropeptides, have been determined by the method of mathematical modeling of multifactor experiments: $C_L = 5.00 \cdot 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, $C_p = 11.67 \cdot 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$, $\tau = 13.21$, pH=5.5, T=37°C. Under certain conditions, 6.58 mg / cm³ of low molecular weight peptides are accumulated, including 4.35 mg/cm³ of low molecular weight muropeptides with a molecular weight in the range of 300–700 Da.

The scientific bases of obtaining bioavailable forms of essential biometals by nanoconstruction of organic complexes of bioelements in which low - molecular products of destruction of bacterial peptidoglycans and products of metabolism play the role of mixed ligand systems are substantiated in the work. It is proved that the obtained forms of metals have a chelated structure, are resistant to aggressive pH values and high temperatures, which determines the prospects of their use in food systems, obtaining which involves high-temperature processing and stability to the gastrointestinal tract.

Technologies of immunotropic dietary supplements "Immunocorrect" and "Vitapostum^{Fe}", functional food ingredients "Immunocorrect*ingredient" and "Vitapostum^{Fe}*ingredient" based on low molecular weight products of destruction of

bacterial peptidoglycans of organosilicons and organics have been developed. Technological modes of their receipt are given and normative documentation for introduction into production is developed, including technical conditions, technological instructions and procedures based on HACCP principles.

The biological activity of the developed dietary supplements and ingredients in vivo has been proven, their toxicity and effective dose are determined. It is established that at intragastric administration the dietary supplement "Immunocorrect" belongs to the 4th class of toxicity – low-toxic substances (LD_{50} more than 10000 mg/kg of body weight). According to the hematological and biochemical parameters of the blood of experimental animals, the state of the immunological organs, the activity of peritoneal exudate cells, the effective dose of supplement was determined, which is 12.5 mg/kg body weight. Comprehensive toxicological studies of the safety and efficacy of the dietary supplements "Vitapostum^{Fe}" in the in vivo experiments have proven the effectiveness of this iron-containing drug as an antianemic, antioxidant and antihypoxant agent based on a daily dose of 15 mg of iron. The technologies of food products with the content of the developed functional food ingredients are substantiated, the prime cost of production and economic efficiency of the developed technologies are calculated.

Key words: functional nutrition, dietary supplement, functional food ingredient, technology, probiotics, postbiotics, peptidoglycan, muropeptides, proteases, muramidases, biometals.

Підписано до друку 22.02.2021 р. Формат 60х84/16.
Папір офсетний. Цифровий друк. Ум. друк. арк. 2,33.
Тираж 100 прим. Зам. № 55/0321.

Видавництво та друк: ОЛДІ-ПЛЮС
вул. Паровозна, 46а, м. Херсон, 73034
Свідоцтво ДК No 6532 від 13.12.2018 р.

Тел.: +38 (0552) 399-580, +38 (098) 559-45-45,
+38 (095) 559-45-45, +38 (093) 559-45-45
Для листування: а/с 20, м. Херсон, Україна, 73021
E-mail: office@oldiplus.ua