ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56201— 2014

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Методы определения бифидогенных свойств

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН коллективом специалистов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт питания» (ФГБНУ «НИИ питания»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 036 «Продукты пищевые специализированные»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 октября 2014 г. № 1471-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (gost.ru)

© Стандартинформ, 2015

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Методы определения бифидогенных свойств

Functional food products.
Methods for the determination of bifidogenic properties

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на функциональные пищевые продукты и функциональные пищевые ингредиенты, обогащенные пробиотическими микроорганизмами или пребиотическими веществами (молочные продукты, молочные составные продукты, молокосодержащие продукты, безалкогольные напитки и биологически активные добавки к пище), и устанавливает методы определения бифидогенных свойств продуктов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018–93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 3–88 Перчатки хирургические резиновые. Технические условия

ГОСТ 245–76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 490–2006 Кислота молочная пищевая. Технические условия

ГОСТ 1129–93 Масло подсолнечное. Технические условия

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2493–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 2768–84 Ацетон технический. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3652–69 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 4145–74 Реактивы. Калий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4159–79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4162–79 Реактивы. Квасцы хромокалиевые. Технические условия

ГОСТ 4198–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4232–74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4526–75 Реактивы. Магний оксид. Технические условия

ГОСТ 5538–78 Калий лимоннокислый 1-водный. Технические условия

ГОСТ 5556–81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5833–75 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 6038–79 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6292–93 Крупа рисовая. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7205–77 Реактивы. Марганец (II) углекислый основной, водный. Технические условия

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ 8927–79 Реактивы. Медь (II) углекислая основная. Технические условия

ГОСТ 9284–75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9393–82 Жир ветеринарный из рыбы и морских млекопитающих. Технические условия

ГОСТ 9412–93 Марля медицинская. Общие технические условия

Издание официальное

ГОСТ 10444.1–84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 10444.11–2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10929–76 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия

ГОСТ ISO 11133-1–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории

ГОСТ ISO 11133-2–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13646–68 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия

ГОСТ 13739–78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805–76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 16317–87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206–96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 19881–74 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 20015–88 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 21239–93 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21240–89 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241–89 (СТ СЭВ 5204–85) Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21400–75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 22280–76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23932–90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363–80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26670–91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 27547–87 Витамин Е (альфа-токоферола ацетат) микрогранулированный кормовой. Технические условия

ГОСТ 27987–88 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия

ГОСТ 28489–90 Микроскопы световые. Термины и определения

ГОСТ 28566–90 Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ ISO 29981–2013Продукты молочные. Подсчет презумптивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37 °С

ГОСТ 31654–2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ 31689–2012 Казеин. Технические условия

ГОСТ 31725–2012 Добавки пищевые. Натрия фосфаты Е339. Общие технические условия

ГОСТ 31747–2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 32007–2012 Добавки пищевые. Кальция фосфаты Е341. Общие технические условия

ГОСТ 32779–2014 Добавки пищевые. Кислота сорбиновая Е200. Технические условия

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ЕН 13060–2011 Стерилизаторы паровые малые

ГОСТ Р 51652–2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 51935–2002 Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ Р 53228–2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **пробиотические микроорганизмы:** Жизнеспособные непатогенные, нетоксигенные микроорганизмы, поступающие в кишечник человека с пищей, благотворно воздействующие на организм человека и нормализующие состав и биологическую активность микрофлоры пищеварительного тракта (преимущественно микроорганизмы родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, вида *Streptococcus thermophilus* в монокультурах и в ассоциациях).

3.2 **бифидогенные свойства:** Способность функциональных пищевых продуктов или их компонентов избирательно стимулировать рост и(или) функциональную активность защитных популяций (микроорганизмов родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) нормальной микрофлоры кишечника.

3.3 **тест-культуры:** Стандартизованные препараты пробиотиков на основе чистых культур микроорганизмов родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Escherichia coli*, выделенных из микробиоты здорового человека, без добавления пребиотических и других стимулирующих компонентов.

3.4 **определение бифидогенных свойств:** Экспериментальная оценка изменений показателей жизнедеятельности микробиологического(их) тест-объекта(ов) *in vitro* или состава и свойств нормальной микрофлоры кишечника *in vivo*

3.5 **представители защитной микрофлоры:** Микроорганизмы кишечной микрофлоры (родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью), обеспечивающие колонизационную резистентность.

3.6 **колонизационная резистентность:** Совокупность механизмов, поддерживающих стабильность популяционного и количественного состава компонентов нормального микробиоценоза.

3.7 **пребиотические вещества:** Неперевариваемые пищевые вещества, избирательно стимулирующие рост и (или) биологическую активность одного или ограниченного числа представителей защитной микрофлоры кишечника человека, способствующие поддержанию ее нормального состава и биологической активности.

4 Средства измерения, оборудование и реактивы

4.1 Оборудование и средства измерений

Стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ Р ЕН 13060, ГОСТ Р 51935.

Оборудование для сухой стерилизации (шкаф сушильный стерилизационный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима в диапазоне от 50 °С до 200 °С с погрешностью ± 2 °С.

Термостат электрический суховоздушный с диапазоном рабочих температур от 20 °С до 60 °С и отклонением от заданной температуры не более ± 1 °С.

Термошейкер-инкубатор для колб с регулируемой скоростью 1–99 об/мин и углом наклона 1–10°.

Весы лабораторные общего назначения, 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 1000 г по ГОСТ Р 53228.

Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709.

Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 с мощностью бактерицидных ламп 30Вт и производительностью (95 % обеззараживания) не менее 300 $м^3$/час.

Анализатор потенциометрический для контроля pH по ГОСТ 19881 с диапазоном измерения pH 3–8, с точностью ± 0,01 единицы pH при температуре 25 °С по ГОСТ 27987.

Инкубаторы-анаэростаты или другие устройства, создающие анаэробные условия культивирования.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 16317.

Электроплитка

Отраслевой стандарт для визуальной оценки мутности бактериальных взвесей № 10 по [1].

Бокс биологической защиты класса II.
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3000 об/мин.
Морозильная камера, обеспечивающая температуру не выше минус 20 °С.
Микроскоп биологический с иммерсионной системой по ГОСТ 28489.
Дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования от 100 до 1000 мкл.

4.2 Лабораторная посуда и материалы

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.
Пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 29227.
Пробирки типов П1, П2 по ГОСТ 25336.
Спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932.
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С с ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 13646.
Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.
Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.
Наконечники пластиковые объемом 100–1000 $мм^3$.
Ножницы медицинские по ГОСТ 21239.
Анаэробные контейнеры с оборудованием для генерирования анаэробной атмосферы, включая систему для проверки анаэробных условий.
Петля бактериологическая платино-иридиевая или никель-хромовая диаметром 3 мм.
Петля бактериологическая полимерная объемом 1, 10 $мм^3$.
Пинцет медицинский по ГОСТ 21241.
Скальпель хирургический, 15 см по ГОСТ 21240.
Термоконтейнер (сумка-холодильник).
Марля медицинская по ГОСТ 9412.
Пакеты полимерные для стерилизации лабораторных принадлежностей и обеззараживания отходов.
Перчатки полимерные по ГОСТ 3.
Колбы плоскодонные конические разной вместимости по ГОСТ 1770.
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.
Флакон-диспенсер для дозирования жидкостей.
Флаконы с резьбой и крышкой стерилизуемые объемом 500–1000 $см^3$.
Фильтры мембранные с размером пор 0,2 мкм.
Пипетки градуированные по ГОСТ 29227.
Палочки стеклянные по ГОСТ 21400.
Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.
Стекла часовые.
Шпатели бактериологические.
Чашки биологические стеклянные Петри по ГОСТ 23932.
Штативы для пробирок.

4.3 Реактивы и питательные среды

Йод по ГОСТ 4159.
Натрий хлористый по ГОСТ 4233.
Калий йодистый по ГОСТ 4232.
Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.
Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493.
Калия гидроокись по ГОСТ 24363.
Натрий фосфорнокислый однозамещенный (дигидрофосфат) 2-водный по ГОСТ 245.
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (гидрофосфат) по ГОСТ 31725.
Кислота соляная по ГОСТ 3118.
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.
Ацетон по ГОСТ 2768.
Водорода пероксид по ГОСТ 10929.
Хлороформ по ГОСТ 20015.
Набор реагентов для окраски по Граму.
Кристаллический фиолетовый.
D-лактоза 1-водная.
D-глюкоза по ГОСТ 6038.
Пептон мясной ферментативный по ГОСТ 13805.

Твин-80.
Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.
Кислота молочная по ГОСТ 490.
Кислота лимонная моногидрат по ГОСТ 3652, х. ч. или ч.
Кислота тиогликолевая.
Натрия тиогликолят.
Натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280.
Агар микробиологический по ГОСТ 17206.
Кислота сорбиновая по ГОСТ 32779.
Неомицин (сульфат или основание), содержание основного вещества не менее 98 %.
Диклоксациллина (натриевая соль), содержание основного вещества не менее 98 %.
L-цистеин гидрохлорид.
Среда тиогликолевая.
TOS-MUP агар (TOS пропионатный агар с мупироцином лития).
Среда МРС (MRS) жидкая.
Среда МРС (MRS) агаризованная.
Среда Блаурокка модифицированная.
Среда гидролизатно-молочная.
Среда кукурузно-лактозная.
Среда М-17.
Кровь баранья дефибринированная баранья или лошадиная, для питательных сред, стерильная.
Среда Эндо.
Агар Симмонса цитратный.
Среда Кесслер с лактозой.
Агар трипказо-соевый с 5 % бараньей крови.
Среда молочно-ингибиторная (МИС).
Среда Сабуро агаризованнная.
Среда Чапека.
Агар Байрд-Паркера.
Солевой агар (основа желточно-солевого агара).
Среда железосульфитная.
Агар трехсахарный.
Среды Гисса.
Фенилаланин-агар.
Препарат полиферментный панкреатин (порошок, содержит липазы 10000 Ед. Евр. Фарм., амилазы 7200 Ед Евр.Фарм., общая протеолитическая активность – не менее 400 Ед. Евр.Фарм.).
Пепсин К 10 % по [2].
Яйца куриные пищевые по ГОСТ 31654.
Индикаторы для контроля паровой и суховоздушной стерилизации.
Экстракт дрожжевой сухой.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Системы (мультимикротесты) для биохимической идентификации энтеробактерий*.
Системы (мультимикротесты) для биохимической идентификации бифидобактерий API 20A** или с аналогичными характеристиками.
Системы (мультимикротесты) для биохимической идентификации лактобактерий API 50CHL*** или с аналогичными характеристиками.

---

* Примерами мультимикротестов для биохимической идентификации энтеробактерий могут быть API 10S, API 20E, API Rapid 20E, Enterotube. Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других мультимикротестов с аналогичными свойствами.

** Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других мультимикротестов с аналогичными свойствами.

*** Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других мультимикротестов с аналогичными свойствами.

Казеин по ГОСТ 31689.
Крахмал маисовый.
Масло подсолнечное по ГОСТ 1129.
Лярд.
Целлюлоза микрокристаллическая.
Витамин Е (токоферол) по ГОСТ 27547.
Витамин А (ретинол А ацетат), содержание основного вещества не менее 98 %.
Витамин D (эргокальциферол), содержание основного вещества не менее 98 %.
Витамин B_1 (тиамина гидрохлорид), содержание основного вещества не менее 98 %.
Рыбный жир по ГОСТ 9393.
Витамин B_2 (рибофлавин), содержание основного вещества не менее 98 %.
Витамин B_6(пиридоксина гидрохлорид), содержание основного вещества не менее 98 %.
Витамин B_{12} (цианкобаламин), содержание основного вещества не менее 98 %.
Витамин РР (никотинамид), содержание основного вещества не менее 98 %.
Кальция пантотенатсодержание основного вещества не менее 98 %.
Кислота фолиевая, содержание основного вещества не менее 98 %.
Биотин, содержание основного вещества не менее 98 %.
Менадиона натрия бисульфит, содержание основного вещества не менее 98 %.
Кальция ортофосфат по ГОСТ 32007.
Калий лимоннокислый трехзамещенный 1-водный по ГОСТ 5538.
Калий сернокислый по ГОСТ 4145.
Оксид магния по ГОСТ 4526.
Марганец углекислый по ГОСТ 7205.
Железо (III) лимоннокислое, 1–водное, ч., содержание основного вещества не менее 98 %.
Цинк углекислый основной, ч., содержание основного вещества не менее 98 %.
Медь (II) углекислая основная по ГОСТ 8927.
Натрий селенистокислый, ч., содержание основного вещества (Na_2SeO_3), не менее 98,5 %.
Квасцы хромокалиевые по ГОСТ 4162.
Сахароза по ГОСТ 5833.
Инулин (полифруктозан, фруктоолигосахарид) растительный пищевой, содержание основного вещества не менее 90 %.
Рис шлифованный белый по ГОСТ 6292.

Питательные среды и препараты должны соответствовать нормативным документам или документам производителя. Приготовление и контроль качества питательных сред осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 11133-1 и ГОСТ ISO 11133-2.

Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования с техническими характеристиками не хуже указанных в настоящем стандарте. Допускается использование других реактивов по качеству и чистоте не ниже вышеуказанных.

4.4 Тест–культуры

Тест-культуры *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *E.coli* сопровождаются «Паспортом штамма», выданным в соответствии с действующими нормативными документами, видовая или родовая принадлежность контрольных тест-культур должна быть подтверждена с использованием биохимических методов идентификации с помощью мультимикротестов (см. 4.3) и световой микроскопии.

Контрольные пробиотические продукты должны быть охарактеризованы по количеству жизнеспособных клеток (КОЕ) соответствующих культур, идентифицированных по родовой и видовой принадлежности.

4.5 Лабораторные животные

Для анализа в модели *in vivo* используют лабораторных животных - крыс – самцов линии Вистар, прошедших карантин в соответствии с [3], [4]. Состав рациона для лабораторных животных, их содержание и схема проведения анализа приведены в приложении Б.

4.6 Приготовление материалов, реактивов, питательных сред

4.6.1 Подготовка посуды и материалов

Вымытую посуду стерилизуют в сушильном шкафу при (160 ± 5) °С в течение 2 ч или в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин с последующим подсушиванием в сушильном шкафу.

Чашки Петри, пипетки и т. п. стерилизуют завернутыми в плотную оберточную бумагу или в пеналах. В верхнюю часть пипетки предварительно вкладывают кусочек ваты.

Пробирки, флаконы, бутылки, колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробки (кроме пробирок) надевают бумажный колпачок, который обвязывают вокруг горлышка ниткой или закрепляют резиновым колечком.

Каучуковые, корковые и стеклянные пробки стерилизуют отдельно в автоклаве, упакованными в бумагу.

Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками. Срок хранения стерильной посуды – не более 30 сут при ненарушенной упаковке или в невскрытых пеналах.

4.6.2 Приготовление буферных растворов

4.6.2.1 Фосфатный буферный раствор

Для приготовления концентрированного фосфатного буферного растора (34 ± 0,4) г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) растворяют в объеме от 500,0 до 700,0 $см^3$ дистиллированной воды в мерной колбе, вместимостью 1000 $см^3$по ГОСТ 1770. Устанавливают активную кислотность раствора (7,2 ± 0,1) ед. pH добавлением раствора гидроокиси натрия и доводят дистиллированной водой до 1000,0 $см^3$. Хранят в емкости, укупоренной резиновой пробкой, в условиях холодильника не более 30 сут.

Для приготовления разбавленного раствора 1,25 $см^3$ концентрированного фосфатного буферного раствора вносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$по ГОСТ 1770 и доводят объем дистиллированной водой до метки, проверяют активную кислотность, которая должна составлять (7,1 ± 0,1) ед. pH.

Фосфатный буферный раствор разливают по 9,0 $см^3$ в пробирки, по 100,0 $см^3$ в колбы, вместимостью 200 $см^3$ по ГОСТ 25336, и по 900,0 $см^3$ в колбы, вместимостью 2000 $см^3$ по ГОСТ 25336, закрывают ватными пробками. Стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение (20 ± 1) мин.

4.6.2.2 Фосфатно-тиогликолевый буферный раствор

Состав (г ($см^3$)/$дм^3$):

калия дигидрофосфат (KH_2PO_4) – 4,5 г;

натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный – 6,0 г;

агар-агар – 1,0 г;

тиогликолевая кислота – 0,4 $см^3$.

1,0 г агар-агара, 6,0 г натрия гидрофосфата и 4,5 г калия дигидрофосфата растворяют при нагревании в 100 $см^3$ дистиллированной воды. Остужают, пипеткой добавляют 0,4 $см^3$ тиогликолевой кислоты, устанавливают активную кислотность раствора (6,8 ± 0,1) ед. pH и доводят объем смеси до 1000 $см^3$. Разливают фосфатно-тиогликолевый буферный раствор по 9,0 $см^3$ в пробирки, по 100,0 $см^3$ в колбы, вместимостью 200 $см^3$, и по 900,0 $см^3$ в колбы, вместимостью 2000 $см^3$, закрывают ватными пробками. Стерилизуют автоклавированием при (112 ± 1) °С в течение 5 мин.

Перед употреблением фосфатно-тиогликолевый буферный раствор разогревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин для снижения в нем содержания растворенного кислорода. В момент использования температура раствора должна составлять (38 ± 1) °С.

4.6.2.3 Раствор лимоннокислого натрия

В 1000,0 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 20 г трехзамещенного лимоннокислого натрия, разливают в пробирки по 9,0 $см^3$или колбы; стерилизуют автоклавированием при (121 ± 1) °С в течение (20 ± 1) мин.

4.6.2.4 Цитратно-фосфатный буферный раствор

Цитратно-фосфатный буферный раствор (ЦФБР) с pH в диапазоне от 2,2 до 7,0 получают смешиванием двух исходных растворов: натрия гидрофосфата 2-водного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) с молярной концентрацией 0,2 моль/$дм^3$ (35,63 г/$дм^3$) и моногидрата лимонной кислоты ($C_3H_4OH(COOH)_3 \cdot H_2O$) с молярной концентрацией 0,1 моль/$дм^3$ (21,01 г/$дм^3$). Объемы исходных растворов варьируют в зависимости от заданного значения pH ЦФБР. Соотношения исходных растворов приведены в приложении В.

Приготовленные растворы ЦФБР стерилизуют автоклавированием при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

4.6.3 Приготовление питательных сред для культивирования пробиотических микроорганизмов

4.6.3.1 Питательные среды для культивирования бактерий рода *Lactobacillus*

а) Среда МРС (MRS) жидкая – по ГОСТ10444.11.

б) Среда МРС (MRS) агаризованная – по ГОСТ 10444.11.

Для повышения селективности питательной среды, после стерилизации к 1 $дм^3$ агаризованной или жидкой среды добавляют 1 $см^3$ щелочного раствора сорбиновой кислоты.

в) Щелочной раствор сорбиновой кислоты

1 г сорбиновой кислоты переносят, смывая раствором гидроокиси натрия (NaOH) с молярной концентрацией 1 моль/дм^3, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, объем доводят до метки тем же раствором. Полученный раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670 при использовании мембранных фильтров с размером пор 0,2 мкм.

Допускается готовить раствор сорбиновой кислоты без фильтрации с соблюдением правил асептики, при этом используют раствор гидроокиси натрия, приготовленный в асептических условиях растворением NaOH в стерильной дистиллированной воде.

4.6.3.2 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Bifidobacterium*

а) Печеночно-цистеиновая среда Блаурокка

0,5 кг свежей говяжьей печени очищают от пленок и желчных протоков, измельчают, заливают 1000 см^3 дистиллированной воды и кипятят в течение 1,5–2 ч. Отвар фильтруют, доводят до 1000 см^{3}дистиллированной водой. К полученному печеночному бульону добавляют 5,0 г натрия хлорида и 10,0 г пептона мясного ферментативного, устанавливают активную кислотность (8,15 ± 0,50) ед. pH с помощью 10 %-ного раствора NaOH и кипятят 10 мин. Полученную основу среды стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин. На следующий день основу среды декантируют, доводят дистиллированной водой до 1000 см^3, добавляют 5,0 г глюкозы, 0,8 г агар-агара, 0,3 г цистеина. Смесь кипятят 10 мин, устанавливают pH на уровне (7,7 ± 0,1) ед. pH, затем среду разливают в пробирки по 10 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Среду Блаурокка проверяют на стерильность путем выдержки при температуре (37 ± 1) °С в течение двух суток. Хранят готовую среду не более 1 мес при температуре (20 ± 2) °С и не более 2 мес при температуре (4 ± 2) °С. Ростовые качества каждой серии среды Блаурокка контролируют высевом контрольной тест-культуры *Bifidobacterium spp.*

б) Тиогликолевая среда

В 1000 см^3 дистиллированной воды вносят 15,0 г гидролизата казеина ферментативного сухого, 5,0 г дрожжевого экстракта, 2,5 г хлорида натрия, 0,75 г агара микробиологического, размешивают и нагревают до температуры 60 °С – 70 °С. L-цистин предварительно растворяют при постепенном добавлении 10 %-ного раствора NaOHдо полного растворения. Раствор цистина вносят в приготовленную смесь, устанавливают pH 8,0–8,2 с помощью 10 %-ного раствора NaOH, кипятят в течение 2–3 мин до полного расплавления агара. Добавляют 5,0 г глюкозы и 0,3 см^3 тиогликолевой кислоты (или 0,5 г натрия тиогликолята), фильтруют через фильтровальную бумагу, устанавливают pH 7,2–7,3 с помощью 5 %-ного раствора соляной кислоты.

Среду разливают в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят в защищенном от света месте при температуре 18 °С – 25 °С.

в) Гидролизатно-молочная среда

Гидролизованное молоко готовят по ГОСТ 10444.11.

Для приготовления 1000 см^3 среды 150 см^3 гидролизованного молока, разводят дистиллированной водой в соотношении 1:1, добавляют 2,5 г агара и нагревают до полного растворения агара. В 700 см^3 дистиллированной воды вносят 20 г пептона ферментативного, 3,5 г хлорида натрия, 10 г лактозы и 0,5 г аскорбиновой кислоты; смесь нагревают до температуры (80 ± 2) °С, после чего соединяют с расплавленным агаром. В смеси устанавливают pH (7,4 ± 0,1) ед. pH, кипятят в течение (15 ± 1) мин, дают отстояться, сливают с осадка, не фильтруя.

Среду разливают в пробирки по 10,0 см^3 и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 30 мин.

г) Кукурузно-лактозная среда

Для приготовления 1000 см^3 среды в 100 см^3 дистиллированной воды вносят 2,5 г агара и нагревают до полного растворения агара. К 800 см^3 дистиллированной воды добавляют 10 г пептона, 10 г лактозы, 40,0 см^3 водного раствора кукурузного экстракта, разбавленного в соотношении 1:6, 6 г лимоннокислого трехзамещенного натрия, 0,12 г сернокислого магния, 2 г фосфорнокислого двузамещенного калия, 0,5 г аскорбиновой кислоты, раствор нагревают до температуры (80 ± 2) °С, после чего соединяют с расплавленным агаром. Полученную смесь доводят до объема 1000 см^{3}горячей дистиллированной водой и устанавливают pH среды (7,0 ± 0,1) ед. pH с помощью 10 %-ного раствора NaOH. Среду разливают в пробирки по 10,0 см^3 и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 30 мин. Готовую среду хранят не более 1 мес при температуре (4 ± 2) °С.

4.6.3.3 Приготовление селективных сред для культивирования бактерий рода *Bifidobacterium*

а) TOS-MUP агар (TOS пропионатный агар с мупироцином лития) готовят по ГОСТ ISO 29981.

б) Среды с неомицином

Среды готовят в два этапа:

1) приготовление раствора неомицина

50 г неомицина (сульфата или основания) растворяют в 500,0 см^3 дистиллированной воды. Массовая концентрация неомицина в растворе 100 г/дм^3.

2) В составе гидролизатно-молочной или кукурузно-лактозной среды массовую долю агара увеличивают до 17 г в 1000 см^3 питательной среды. Среды разливают в широкие пробирки но (20,0 ± 0,5) см^3 и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 30 мин.

При проведении анализа в готовые среды перед расплавлением вносят раствор неомицина из расчета 0,2 см^3 раствора на 20 см^3 среды.

в) Питательная среда МРС (MRS) с диклоксациллином

Среду готовят в три этапа:

1) Приготовление раствора селективного агента

Состав:

- диклоксациллин – 25 мг;
- дистиллированная вода – 50 см^3.

Диклоксациллин растворяют в дистиллированной воде, затем полученный раствор стерилизуют фильтрацией, срок хранения раствора – 15 сут при температуре 4 °С.

Примечание – Допускается готовить раствор диклоксациллина без фильтрации: диклоксациллин в асептических условиях растворяют в стерильной дистиллированной воде.

Непосредственно перед использованием готовят рабочее разведение этого раствора 1:10.

2) Приготовление антиоксидантного раствора

Состав:

- L-цистеина гидрохлорид – 3 г;
- дистиллированная вода – 100 см^3.

L-цистеина гидрохлорид растворяют в дистиллированной воде и стерилизуют фильтрацией. Раствор разливают по 10 см^3 в стерильные пробирки. Хранят раствор 15 сут при температуре 4 °С.

Примечание – Допускается готовить раствор хлористого цистеина без фильтрации: в асептических условиях растворяют хлористый цистеин в стерильной дистиллированной воде.

3) Приготовление питательной среды МРС (MRS)

Готовую среду МРС (MRS) расплавляют и выдерживают в кипящей водяной бане в течение 20 мин для регенерации. Затем среду охлаждают до 40 °С – 45 °С и вносят растворы селективного агента в количестве 1 см^3 на 100 см^3 среды и антиоксиданта – 1 см^3 на 100 см^3 среды. Смесь аккуратно перемешивают, не допуская насыщения среды воздухом.

4.6.4 Приготовление питательной среды (кровяного агара) для культивирования бактерий рода *Streptococcus*[*]

К растопленному и охлажденному до 45 °С – 50 °С питательному агару с 1 % глюкозы добавляют 3–5 % по объему дефибринированной крови животных. Разливают в чашки Петри диаметром 90 мм по ГОСТ 23932 по 20 см^3 среды и подсушивают при температуре 37 °С.

Допускается для культивирования бактерий рода *Streptococcus* применение трипказо-соевого агара с 5 % бараньей крови промышленного изготовления.

4.6.5 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Bacteroides*

4.6.5.1 Неомицин-агар для бактероидов

К 1 дм^3 дистиллированной воды добавляют до 10г пептона, 3,0 г хлористого натрия, 2,0 г гидрофосфата натрия, 3,0 г сухого мясо-пептонного бульона, 4,0 г дрожжевого экстракта, 6,0 г декстрозы, 1,0 см^3 твин-80, 20,0 г агара, устанавливают pH среды (7,2 ± 0,1) ед. pH, стерилизуют при 112 °С в течение 30 мин. Перед разливом в чашки к основному агару добавляют: 250 мг цистина, 80 мг неомицина, 200 мг дезоксихолата натрия, 30 см^3 дефибринированной бараньей или лошадиной крови.

4.6.5.2 Желчно-эскулиновый агар для бактероидов (BBE) для селективного выделения, идентификации и культивирования микроорганизмов группы *Bacteroides fragilis*

Основу среды готовят в соответствии с указаниями изготовителя на этикетке, остужают до 45 °С – 50 °С, асептично добавляют регидратированное содержимое флакона с селективной добавкой (содержимое флакона – 50 мг гентамицина, достаточно для приготовления 500 см^3 готовой среды).

4.6.6 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *E. coli* и рода *Proteus*

4.6.6.1 Среда Эндо

[*] При добавлении 6 % - 10 % крови среда может использоваться для определения общего числа аэробных и анаэробных микроорганизмов.

Среду Эндо промышленного производства готовят согласно рекомендациям изготовителя. Разлитую в стерильные чашки Петри готовую среду допускается хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 10 сут.

4.6.6.2 Среда Симмонса

1,5 г фосфорнокислого натрия-аммония, 1 г фосфорно-кислого двузамещенного калия, 0,2 г сульфатамагния, 3 глимоннокислого трехзамещенного натрия растворяют в 950,0 см^3 дистиллированной воды, добавляют 10,0 см^3 0,5 %-ного спиртового раствора бромтимолового синего. Устанавливают активную кислотность (6,8 ± 0,1) ед. pH растворами NaOH или HCl, проверяя значение pH на потенциометре. Добавляют 2 г агар – агара, доводят объем дистиллированной водой до 1000 см^3, прогревают на водяной бане до расплавления агара, стерилизуют в течение (15 ± 1) мин при (121 ± 1) °С. Разливают в стерильные чашки Петри или пробирки.

4.6.6.3 Среда Кесслер с лактозой

Используют сухую питательную среду Кесслер промышленного производства в соответствии с инструкцией по приготовлению, или готовят в соответствии с ГОСТ 31747.

4.6.7 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Enterococcus*

Молочно-ингибиторную среду (МИС) готовят по ГОСТ 28566.

Среду МИС промышленного производства готовят согласно рекомендациям изготовителя.

4.6.8 Приготовление питательных сред для выделения патогенных микроорганизмов (бактерий родов *Shigella, Salmonella*)

Среды Плоскирева и висмут-сульфитный агар (ВСА) промышленного производства готовят согласно рекомендациям изготовителей, указанным на этикетках. Изготовленные и разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить в холодильнике в течение 10 сут.

4.6.9 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Staphylococcus*

4.6.9.1 Агар Байрд-Паркер

Основа среды: 30 г сухого питательного агара на основе ферментативного гидролизата кормовых дрожжей размешивают в 1,0 дм^3 дистиллированной воды, добавляют 10 г пирувата натрия, 5 г хлористого лития, тщательно перемешивают. Смесь нагревают при помешивании и кипятят в течение 1 мин до полного растворения ингредиентов. Устанавливают активную кислотность (7,1 ± 0,1) ед. pH. Разливают во флаконы объемами 100, 200 и 300 см^3 и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин. Основа среды может храниться в течение месяца в условиях холодильника. Перед употреблением в растопленную и охлажденную 45 °С – 50 °С основу, с соблюдением правил асептики прибавляют (из расчета на 100,0 см^3 среды) 0,5 см^3 2 %-ного раствора теллурита калия и 5,0 см^{3}яично-желточной эмульсии, приготовленной по ГОСТ 10444.1. Среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри, в объеме, не менее 20,0 см^3 на чашку. Чашки со средой могут быть использованы в течение 24–48 ч. Перед посевом чашки со средой подсушивают в термостате по ГОСТ ISO 11133-1.

4.6.9.2 Желточно-солевой агар (ЖСА)

Основа среды (солевой агар): для приготовления 1000 см^3 солевого агара к мясо-пептонному бульону с активной кислотностью (7,3 ± 0,1) ед. pH добавляют 20 г агара и 65 г хлористого натрия, нагревают на водяной бане до расплавления агара, при необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 100,0 см^3 в колбы вместимостью 250 см^3, и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

Перед употреблением на 100,0 см^3 растопленного и охлажденного до (45 ± 1) °С солевого агара добавляют 20,0 см^3 эмульсии яичного желтка, приготовленной по ГОСТ 10444.1. После размешивания желточно-солевой агар разливают в стерильные чашки Петри по 20,0–25,0 см^3 и хранят в холодильнике не более 7 сут.

4.6.10 Приготовление железосульфитной среды для культивирования сульфитредуцирующих клостридий

К 1000 см^3 дистиллированной воды добавляют 10 г пептона, 0,5 г сульфита натрия, 0,5 г железа (III) цитрата, 1,5 г агар-агара. Компоненты растворяют при нагревании, после этого смесь охлаждают до (50 ± 5) °С. Устанавливают pH среды таким образом, чтобы он составлял (7,1 ± 0,1) ед. pH. Среду разливают в пробирки по 10–12 см^3 и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Допускается применение железосульфитной среды (железосульфитного агара) промышленного производства, которую готовят согласно инструкциям изготовителя.

4.6.11 Приготовление сред для культивирования дрожжеподобных грибов и плесеней

4.6.11.1 Приготовление среды Сабуро для культивирования дрожжеподобных грибов и плесеней

К 1,0 дм^3 дистиллированной воды добавляют 18 г агара, 40 г мальтозы или глюкозы и 10 г пептона, нагревают до полного растворения. Устанавливают уровень pH таким образом, чтобы после

стерилизации при 25 °С он составлял (6,5 ± 0,1) ед. pH. Разливают колбы и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят в холодильнике не более 14 сут.

4.6.11.2 Приготовление рисового агара для определения хламидоспор дрожжеподобных грибов

20 г белого риса заливают 1,0 дм^3 дистиллированной воды, доводят до кипения, затем выдерживают на малом огне 45 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доводят объем водой до 1 дм^3, вносят 18–20 г агара, растворяя его кипячением. Среду разливают в пробирки и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят в холодильнике не более 14 сут, перед посевом среду расплавляют в кипящей водяной бане, переливают в чашки Петри. Чашки со средой подсушивают в термостате по ГОСТ ISO 11133-1.

4.6.12 Приготовление растворов и реактивов

4.6.12.1 Стерильная дистиллированная вода

Дистиллированную воду разливают в колбы или пробирки в необходимых количествах и стерилизуют в течение 20 мин при (121 ± 1) °С.

4.6.12.2 Раствор натрия гидрокарбоната для нейтрализации проб 10 г гидрокарбоната натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют дистиллированной водой, доводят объем раствора до метки. Раствор разливают в пробирки и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

4.6.12.3 Реактивы для окраски по Граму готовят по ГОСТ ISO 7218.

Допускается использовать готовые растворы промышленного производства в соответствии с рекомендациями изготовителя.

4.6.13 Среды сухие промышленного изготовления, указанные в 4.3, готовят согласно рекомендациям изготовителей, указанным на этикетках.

4.6.14 Требования безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования безопасности при подготовке и проведении анализа, требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.018, электробезопасности по ГОСТ Р 12.1.019, а также требования, изложенные в технических документах на применяемые средства измерений и вспомогательное оборудование. Микробиологические анализы проводят с соблюдением требований ГОСТ ISO 7218.

4.6.15 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке результатов допускается специалист, имеющий опыт работы в микробиологической лаборатории, освоивший методы и прошедший инструктаж по технике безопасности при работе с вредными веществами и пожарной безопасности.

5 Методы определения бифидогенных свойств

5.1 Метод определения бифидогенных свойств *in vitro* 1

5.1.1 Сущность метода

Метод оценки *in vitro* 1 бифидогенной активности функциональных пищевых продуктов основан на выявлении чувствительности к воздействию функционального пищевого продукта тест-штаммов микроорганизмов представителей популяций защитной микрофлоры кишечника человека родов *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp.* и *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью.

Тест-культуры *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp.* и *E. coli* вносят в модельные субстраты, содержащие функциональные пищевые продукты, или без них (контрольные пробы), методом предельных (исчерпывающих) концентраций, выдерживают при оптимальных условиях инкубации и затем изучают морфологические, кинетические, функциональные и количественные параметры их роста.

Экспериментальную модель составляют из параллельных рядов пробирок с последовательными десятикратными разведениями *Lactobacillus, Bifidobacterium* и *E. coli* в соответствующих питательных средах: среда МРС жидкая для *Lactobacillus spp*, тиогликолевая, гидролизатно-молочная или кукурузно-лактозная среды для *Bifidobacterium spp*, среда Кесслер с лактозой для *E. coli*. В опытные ряды инокулированных тест-штаммами питательных сред вносят анализируемый функциональный пищевой продукт; контролем являются десятикратные разведения тест-микроорганизмов без добавления функционального пищевого продукта (ингредиента).

Расчет концентрации функционального пищевого продукта (ингредиента), вносимого в модельные среды, проводят таким образом, чтобы она обеспечивала соотношение «Суточная доза функционального пищевого продукта/объем желудка взрослого человека», при этом за средний объем желудка взрослого человека принимают величину 2250 см^3.

Пример расчета: Если суточная доза функционального пищевого продукта составляет 50 г, его концентрация в модельной среде рассчитывается по формуле: $\frac{50}{2250}$ ***и должна составлять 22,2 мг/см^3. Для получения этой расчетной концентрации в пробирку с 9 см^3 модельной среды вносят 1 см^3 раствора (взвеси) функционального пищевого продукта с концентрацией 222 мг/см^3.***

По результатам анализа устанавливают значения предельных разведений тест-культур, в которых имеет место рост микроорганизмов, характерных для представителей соответствующих популяций кишечной микрофлоры, путем регистрации визуальных признаков типичных колоний в средах культивирования и(или) при подтверждающем пересеве на элективные среды, а также наличия клеток типичной морфологии при микроскопии мазков-препаратов.

На основании полученных результатов делается вывод о наличии бифидогенного действия функционального пищевого продукта (ингредиента) или об отсутствии бифидогенного действия в модели *in vitro*.

5.1.2 Проведение анализа

Анализ проводят по схеме:

Контроль: тест-культуры микроорганизмов – *Lactobacillus spp., Bifidobacterium spp. и E. coli.*

Ряды пробирок с последовательными десятикратными разведениями тест-культур:

1 ряд – тест-культура *Lactobacillus spp.* с 10^{-1} разведения до 10^{-15} разведения, без функционального пищевого продукта (контроль);

2 ряд – тест-культура *Bifidobacterium spp.* с 10^{-1} разведения до 10^{-15} разведения, без функционального пищевого продукта (контроль);

3 ряд – тест-культура *E. coli* с 10^{-1} разведения до 10^{-15} разведения, без функционального пищевого продукта (контроль);

4 ряд – тест-культура *Lactobacillus spp.* с 10^{-1} разведения до 10^{-15} разведения и 1 см^3 раствора функционального пищевого продукта расчетной концентрации;

5 ряд – тест-культура *Bifidobacterium spp.* с 10^{-1} разведения до 10^{-15} разведения и 1 см^3 раствора функционального пищевого продукта расчетной концентрации;

6 ряд – тест-культура *E. coli* с 10^{-1} разведения до 10^{-15} разведения и 1 см^3 раствора функционального пищевого продукта расчетной концентрации.

Инкубирование посевов тест-культуры *E. coli* проводят при (37 ± 0,5) °С в течение 24 ч, тест-культур *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* – в течение 72 ч.

По окончании инкубирования посевов определяют предельные разведения, в которых обнаруживают рост тест-культур микроорганизмов, путем регистрации визуально характерных признаков роста в среде культивирования и при подтверждающем пересеве на дифференциально-диагностические среды, а также путем выявления клеток типичной морфологии при микроскопии мазков-препаратов (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Характер роста тест-культур микроорганизмов

Микроорганизмы	Питательная среда	Признаки роста в жидких средах и характеристика колоний на плотных/полужидких средах
Бактерии рода *Lactobacillus*	Среда МРС жидкая	Помутнение среды, образование осадка, пристеночный рост
	Среда МРС агаризованная	Колонии мелкие, диаметром 1– 3 мм, гладкие или зернистые, плоские или слегка выпуклые, бесцветные или слабо пигментированные
Бактерии рода *Bifidobacterium*	Тиогликолевая среда	Кометы, гвоздики, шарики, иголочки различной длины и конфигурации
	Гидролизатно-молочная среда или кукурузно-лактозная среда	Колонии от белого и серого до темно-коричневого цвета, в виде крупинок, гречишного зерна или дисков, иногда комето- или гвоздикообразные

Окончание таблицы 1

Микроорганизмы	Питательная среда	Признаки роста в жидких средах и характеристика колоний на плотных/полужидких средах
	МРС (MRS)–агар с диклоксациллином	Колонии небольшого размера – от 1 до 3 мм, молочно-белые, блестящие с серым или бежевым оттенком. Встречаются прозрачные, неокрашенные колонии
	TOS-MUP агар	Колонии диаметром 1–4 мм, белые, с запахом уксусной кислоты. Морфология – от чечевицеобразных до круглых колоний в агаре и от звездоподобных до клеевероподобных колоний на поверхности агара
E. coli	Среда Кесслер с лактозой	Помутнение среды, газообразование
	Среда Эндо	Образование малиновых колоний с металлическим блеском

5.1.3 Обработка результатов

Количественный подсчет тест-культур в полужидких средах производят путем умножения числа выросших колоний на соответствующее разведение. При отсутствии дифференцированного роста колоний учет результатов проводится по предельному разведению, в котором визуально выявляют признаки роста культуры и при микроскопии – клетки с морфологией, типичной для соответствующего тест-штамма. Результатом определения является среднеарифметическое значение величин, полученных при оценке трех параллельных повторностей, которое выражают в десятичных логарифмах – lgKOE/см^3 среды.

Вывод о наличии или отсутствии бифидогенного действия анализируемого функционального пищевого продукта на микробиоту делают на основании оценки следующих критериев:

1) при обнаружении одинакового количества тест-культур микроорганизмов в средах с анализируемым продуктом и в контрольных средах (без добавления продукта) делается вывод об отсутствии ингибирующего и бифидогенного действия функционального пищевого продукта в модели *in vitro* 1.

2) в случае достоверного превышения количества тест-культур микроорганизмов в средах с анализируемым продуктом в сравнении с контролем на 1,0 lgKOE/см^3 и более делается вывод о стимулирующем бифидогенном действии функционального пищевого продукта в модели *in vitro* 1.

3) в случае достоверного уменьшения количества тест-культур микроорганизмов в средах с анализируемым продуктом в сравнении с контролем не менее чем на один логарифмический порядок делается вывод об отсутствии бифидогенного действия анализируемого продукта и о его ингибирующем действии в модели *in vitro*1.

5.2 Метод определения бифидогенных свойств *in vitro* 2

5.2.1 Сущность метода

Метод оценки *in vitro* 2 бифидогенных свойств основан на изучении воздействия функциональных пищевых продуктов на степень выживания представителей защитной микрофлоры в экспериментальной модели *in vitro* в условиях, имитирующих процесс пищеварения в полости желудка и верхнего отдела тонкой кишки человека.

Примечания

1 Метод включает применение специальных модельных сред на основе цитратно-фосфатного буферного раствора (ЦФБР), сконструированных с учетом средних показателей кислотности желудочного и дуоденального соков и их ферментных компонентов. Условия культивирования инокулированных модельных сред предусматривают термостатирование при 37 °С и непрерывное перемешивание.

2 Воздействие функционального пищевого продукта на представителей защитной микрофлоры оценивают по степени выживания бактериальных популяций тест-штаммов при их инкубации в модельных средах с последовательным переносом инокулятов из сред, имитирующих параметры желудка, в среды с параметрами верхнего отдела тонкой кишки, а также по степени выраженности функциональных свойств тест-культур (антагонизм).

5.2.2 Проведение анализа

Анализ проводят в два этапа

а) 1 этап (модель «желудок»).

В три стерильные колбы, содержащие по 10 $см^3$ цитратно-фосфатного буферного раствора с активной кислотностью (2,5 – 3,0) ед. pH, приготовленного по 4.6.2.4, вносят: тест-культуру микроорганизмов рода *Bifidobacterium* вколичестве $1x10^6$ КОЕ/$см^3$, тестируемый функциональный пищевой продукт в концентрации, рассчитанной по 5.1.1, пепсин в количестве 0,5 мг/$см^3$. Параллельно готовят аналогичную смесь без функционального пищевого продукта (контроль, также в трех повторностях). Для контроля концентрации жизнеспособных клеток тест-штамма из исходной суспензии суточной культуры *Bifidobacterium* делают ряд десятикратных разведений и проводят посев в одну из сред, указанных в 4.6.3.2 для культивирования бактерий рода *Bifidobacterium*.

Инкубирование модельных сред проводят с использованием термошейкера-инкубатора с частотой колебаний 90 об/мин при температуре 37 °С в течение 1,5 ч. Для определения количества живых клеток тест-культуры *Bifidobacterium* после инкубации в модели «желудок» делают высев из каждой колбы в одну из сред, указанных в 4.6.3.2 для культивирования бактерий рода *Bifidobacterium*.

б) 2 этап (модель «тонкая кишка»).

В три стерильные колбы, содержащие по 10 $см^3$ цитратно-фосфатного буферного раствора с pH 7,5, приготовленного по 4.6.2.4, вносят: тестируемый функциональный пищевой продукт в концентрации, рассчитанной по 5.1.1, ферментный препарат по 4.3 в количестве 25 мг/$см^3$, 1 $см^3$ инокулята из колб после первого этапа инкубации со смесью, содержащей функциональный пищевой продукт (опыт). Параллельно готовят аналогичную смесь без функционального пищевого продукта (контроль, в трех повторностях), в которую добавляют по 1 $см^3$ инокулята из контрольных колб 1 этапа. Инкубирование модельных сред проводят с использованием термошейкера-инкубатора с частотой колебаний 90 об/мин при температуре 37 °С в течение 3 ч.

Допускается перед проведением 2-го этапа инкубации в модели «тонкой кишки» инокулят из колб, имитирующих «желудок», нейтрализовать раствором гидроокиси натрия до 7,0 ед. pH и хранить в течение ночи в холодильнике.

После инкубирования проб в модели «тонкой кишки» делают высев из каждой колбы в одну из сред, указанных в 4.6.3.2 для культивирования бактерий рода *Bifidobacterium*.

По окончании инкубации всех засеянных проб через (72 ± 1) ч проводят учет результатов, отмечая наличие (отсутствие) признаков роста *Bifidobacterium spp.*в питательных средах, микроскопируют мазки-препараты из всех проинкубированных посевов, измеряют активную кислотность жидких сред. Количество живых клеток *Bifidobacterium spp* выражают в lg КОЕ/$см^3$.

По окончании инкубации тест-штамма в условиях «желудка» и «тонкой кишки» в опытных и контрольных вариантах смесей оценивают степень выживаемости популяции *Bifidobacterium spp*, которую рассчитывают по количеству жизнеспособных клеток и определяют как индекс выживаемости ИВ по формуле:

$$ИВ = \frac{K1-K2}{K1} \cdot x \cdot 100, \quad (1)$$

где K_1 – число живых клеток тест-штамма до инкубации в модели «желудка» или «тонкой кишки»;

K_2 – число живых клеток тест-штамма после инкубации в модели «желудка» или «тонкой кишки»;

100 – коэффициент, %.

5.2.3 Определение воздействия функционального пищевого продукта на функциональное состояние бактерий рода *Bifidobacterium*

Воздействие функционального пищевого продукта в модели *in vitro* 2 включает определение функционального состояния популяций *Bifidobacterium spp*. по их способности к кислотообразованию в средах культивирования, инокулированных тест-микроорганизмами до и после их выдерживания в моделях, имитирующих процесс пищеварения.

Таблица 2 – Критерии кислотообразующей способности *Bifidobacterium spp*.

pH среды культивирования, ед. pH	Степень кислотообразующей способности *Bifidobacterium spp*.
Менее 4,3	Очень высокая
4,3–4,4	Высокая
4,5–4,6	Умеренная
4,7–4,8	Слабая
4,9–5,1	Очень слабая
Более 5,1	Отсутствие

5.2.4 Обработка результатов определения бифидогенных свойств *in vitro* 2

Для определения наличия бифидогенных свойств функционального пищевого продукта сопоставляют индексы выживаемости тест-штамма(ов) бактерий рода *Bifidobacterium*, полученные в трех независимых опытах при 2–3-х кратном повторении измерений по 5.2.2. Для выявления статистической значимости различий между ИВ *Bifidobacterium spp* в модели, где рост тест-штамма был индуцирован присутствием функционального пищевого продукта, и ИВ интактного тест-штамма, используют непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни для независимых переменных*. Различия между анализируемыми величинами считают достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Наличие у функционального пищевого продукта бифидогенных свойств признают при обнаружении ИВ, достоверно подтверждающего выживание на конечном этапе в модели «тонкой кишки» более, чем 60 % от исходного количества тест-микроорганизмов *Bifidobacterium spp*, внесенных в модель «желудка», и при выявлении у них кислотообразующей способности, которая соответствует исходной или более высокой степени, но составляет значения не выше, чем 4,8 ед. pH среды культивирования.

5.3 Метод определения бифидогенных свойств *in vivo*

5.3.1 Сущность метода

Анализ бифидогенных свойств функционального пищевого продукта в условиях *in vivo* проводят на основании изучения видового состава и количественных уровней основных защитных популяций нормальной микрофлоры кишечника и их функциональной активности. Для этого производят посев содержимого толстого кишечника лабораторных животных, получавших функциональный пищевой продукт с кормом, при сравнении с интактными контрольными животными.

5.3.2 Проведение анализа

5.3.2.1 Анализ *in vivo* бифидогенных свойств функционального пищевого продукта проводят путем посевов содержимого толстого кишечника лабораторных животных, которым вводят в рацион функциональный пищевой продукт, при сравнении с животными, которым вводят функциональный пищевой ингредиент с пребиотическим действием (например, полифруктозанинулин), и контрольными животными, которые получают базовый полусинтетический рацион (см. приложение Б).

Проводят изучение защитных популяций микрофлоры (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp,* лактозоферментирующих бактерий семейства *Enterobacteriaceae)*, а также комменсальных и транзиторных (условно-патогенных) представителей микробиоты (цитратположительных *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, сульфитредуцирующих бактерий рода *Clostridium*, бактерии рода *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, дрожжей и плесневых грибов) на соответствующих дифференциально-диагностических и селективных средах. Изучение комменсальных и транзиторных популяций необходимо для оценки способности *Bifidobacterium spp.* регулировать баланс микроорганизмов в микрофлоре кишечника.

5.3.2.2 Приготовление суспензии содержимого слепой кишки (фекалий) животных

Пробу для анализа из содержимого слепой кишки крыс около 1 г (взвешивают на электронных весах на стерильной подложке) вносят в предварительно регенерированный тиогликолево-фосфатный буфер с 0,1 % агара в соотношении 1:9. Полученную взвесь тщательно гомогенизируют и готовят из нее последовательные десятикратные разведения в фосфатно-тиогликолевом буфере от 10^{-2} до 10^{-10}. Все пробирки с разведениями суспензии перемешивают вручную круговыми движениями руки при согнутом локтевом суставе

Подготовленные разведения используют для посева на дифференциально-диагностические и селективные среды для количественного учета девяти групп микроорганизмов – представителей защитной микрофлоры и представителей транзиторной (сопутствующей) микрофлоры.

5.3.2.3 Проведение количественного микробиологического посева

Суспензию содержимого слепой кишки высевают непосредственно на поверхность плотных питательных среди или в жидкие среды в соответствии со схемой, приведенной в таблице 3. Из соответствующих разведений по 0,05 $см^3$ суспензии распределяют с помощью шпателя или бактериологической петли по поверхности агаризованной среды в чашке Петри. Допускается посев на ½ часть чашки Петри. В жидкие и полужидкие питательные среды вносят по 1 $см^3$ суспензии.

* *U*-критерий Манна – Уитни – статистический критерий, используемый для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно. Применяется для сравнения малых выборок.

Таблица 3 – Схема первичного посева суспензии содержимого слепой кишки

Микроорганизмы: группа, семейство, род, вид	Питательные среды	Разведения анализируемого материала	Сроки, условия инкубации
Общее число анаэробных микроорганизмов	Кровяной агар, 6 % –10 %	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}	До 7 сут в анаэробных условиях при ежедневном контроле роста
Общее число аэробных микроорганизмов	Кровяной агар, 6–10 %	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}	48 ч
Бактерии рода *Lactobacillus*	Среда МРС (MRS) модифицированная	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}	3 сут в микроаэрофильных условиях
Бактерии рода *Streptococcus*	Кровяной агар, 3–5 %	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}	48 ч
Бактерии рода *Bacteroides*	Кровяной агар с неомицином, желчно-эскулиновый агар	10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}	48 ч в анаэробных условиях или в аэробных условиях с применением часовых стекол
Бактерии рода *Bifidobacterium*	Тиогликолевая среда или среда Блаурокка	10^{-6} –10^{-10}	3–5 сут в анаэробных или микроаэрофильных условиях
Enterobacteriaceae	Агар Эндо	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}	24 ч
	Цитратный агар	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}	4 сут
Бактерии рода *Enterococcus*	Молочно-ингибиторная среда	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}	48 ч
Патогенные микроорганизмы: *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*	Висмут-сульфит-агар, среда Плоскирева	10^{-1}	24–48 ч
Бактерии рода *Proteus*	Агар Эндо, цитратный агар		24 ч 4 сут
Бактерии рода *Staphylococcus*	Желточно-солевой агар, среда Байрд-Паркера	10^{-1} , 10^{-3}, 10^{-5}	48 ч
Сульфитредуцирующие бактерии рода *Clostridium*	Железосульфитная среда	10^{-1}–10^{-5}	5 сут в анаэробных или микроаэрофильных условиях
Дрожжевые и дрожжеподобные грибы, плесени	Среда Сабуро	10^{-3}, 10^{-5}	3–5 сут**

*При учете *Clostridium spp.* следует иметь в виду, что почернение среды может быть связано с присутствием сульфитредуцирующих энтеробактерий.

**Температура инкубации составляет 30 °С.

Общее число анаэробных и аэробных микроорганизмов учитывают на кровяном агаре с 6 % – 10 % крови, инкубируемым в анаэробных условиях (в атмосфере углекислого газа 5 % – 10 %) и в аэробных условиях для сопоставления количества и морфологии выросших колоний. Инкубацию проводят при температуре 37 °С в течение 48 ч.

Количество бактерий рода *Bacteroides* определяют с использованием часовых стекол. Из соответствующих разведений анализируемого материала наносят автоматической пипеткой по 0,05 $см^3$ на поверхность кровяного агара с неомицином для бактероидов. После того, как капля «втягивается» в агар, на место посева накладывают предварительно подготовленные часовые стекла с агаром, на который посеяна культура облигатно аэробных бактерий *Serratia marcencens*. Их рост обеспечивает создание анаэробных условий, необходимых для культивирования бесспоровых анаэробных бактерий.

Подготовка часовых стекол

В часовые стекла заливают 1,0–2,0 $см^3$ кровяного агара с неомицином, подсушивают в течение 20 мин в термостате при температуре 37 °С.

Суточную культуру *S. marcescens*, выращенную на скошенном мясо-пептонном агаре, смывают 10 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, взбалтывают и выливают в чашку Петри. Затем стерильным ватным тампоном наносят суспензию на поверхность агара в часовых стеклах. После 4 ч инкубации при температуре 37 °С обработанные таким образом часовые стекла наклады-

вают на поверхность питательной среды, предназначенной для культивирования бактероидов. После инкубации в течение 48 ч выросшие колонии микроскопируют и подсчитывают. Колонии *Bacteroides spp.*– плоские голубоватого цвета с матовой поверхностью, с ровными или зазубренными краями, как правило, колонии мелкие.

5.3.2.4 Обработка результатов количественного микробиологического посева

Учет и обработку результатов проводят по истечении сроков инкубации по числу выросших колоний в посевах из двух последних разведений, с изучением культуральных, тинкториальных (окраска по Граму) и морфологических (микроскопия) свойств. Подсчет проводится на чашках с числом выросших колоний от 5 до 30, с расчетом среднего арифметического показателя.

Количество микроорганизмов определяемых групп, родов, видов К, КОЕ в 1 г фекалий, вычисляют по формуле:

$$К = \text{число выросших колоний на чашке } 20\ n, \qquad (2)$$

где n – разведение суспензии фекалий;

20 – коэффициент пересчета на 1 $см^3$ суспензии фекалий при посеве 0,05 $см^3$ (0,05 $см^3$ составляет 1/20 $см^3$).

Например, в посеве из разведения 10^{-7} выросло 10 колоний. 10 умножают на 20 и умножают на 10^7 (разведение) и получают $2,0 \times 10^9$ КОЕ/г.

Полученные результаты содержания микроорганизмов (плотность популяций) переводят в десятичные логарифмы числа колониеобразующих единиц на 1 г фекалий (содержимого слепой кишки) (lg КОЕ/г).

5.3.2.5 Определение факторов патогенности у транзиторных популяций кишечной микрофлоры

Помимо количественных характеристик у анализируемых транзиторных популяций определяют наличие факторов патогенности, а при необходимости проводят идентификацию родовой и видовой принадлежности, для чего выросшие культуры подвергают дальнейшему анализу.

У *Staphylococcus spp.* определяют наличие лецитиназной и плазмокоагулирующей активности. У бактерий рода *Proteus* выявляют способность к роению и росту на средах, используемых для учета бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

У дрожжеподобных грибов определяют характер филаментации, наличие псевдомицелия и способность к образованию хламидоспор на рисовом агаре.

У бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.* изучают гемолитические свойства на кровяном агаре.

У штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при необходимости проводят определение таксономической принадлежности с использованием систем (мультимикротестов) для биохимической идентификации энтеробактерий или посевом на диагностические среды для определения способности к ферментации углеводов (среды Гисса, трехсахарный агар) и аминокислот (фенилаланин-агар, среды с лизином, орнитином, аргинином).

Морфологию выделенных культур определяют микроскопированием окрашенных по Граму мазков-препаратов.

5.3.3 Определение характеристик защитных популяций микрофлоры

5.3.3.1 Определение функциональной активности бактерий рода *Bifidobacterium*, выделенных из фекалий (содержимого слепой кишки) крыс

Функциональную активность популяции *Bifidobacterium spp.*, выделенной из фекалий (содержимого слепой кишки) крыс, устанавливают по способности закислять среду культивирования путем измерения активной кислотности (pH) в средах культивирования I генерации (непосредственно в пробирках с тиогликолевой средой или средой Блаурокка) на 5 сутки выращивания. Величину pH измеряют потенциометрическим методом во всех пробирках с наличием признаков роста. Контролем служит пробирка с исходной питательной средой. Полученные значения по всем засеянным разведениям продукта, в которых проводилось измерения, суммируют и усредняют, после чего итоговое значение сопоставляют с критериями кислотообразующей способности (степенями кислотообразования) бактерий рода *Bifidobacterium* в соответствии с таблицей 2 (см. 5.2.3).

5.3.3.2 Определение дополнительных характеристик выделенных представителей защитной микрофлоры

Для оценки влияния функциональных пищевых продуктов на представителей основных популяций защитной микрофлоры кишечника выделенные культуры подвергают расширенной идентификации и определению антагонистической активности по тестам, указанным в таблице 4.

Таблица 4 – Дополнительные тесты для характеристики представителей основных популяций защитной микрофлоры кишечника

Микроорганизмы	Биохимические тесты	Антагонистическая активность
Бактерии рода *Bifidobacterium*	Отсутствие каталазы Определение родовой/видовой принадлежности с применением мульти-микротестов для биохимической идентификации	См. 5.3.3.1 и 5.2.3
Бактерии рода *Lactobacillus*	Отсутствие каталазы Определение родовой/видовой принадлежности с применением мульти-микротестов для биохимической идентификации	Определение отсроченного антагонизма методом диффузии в агар по [6]*
Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	Отсутствие оксидазы Определение родовой/видовой принадлежности с применением мульти-микротестов для биохимической идентификации	Определение отсроченного антагонизма методом штриховых подсевов по [6]

*Антагонистическую активность выделенных лактобактерий изучают по отношению не менее, чем к пяти тест-штаммам грамотрицательных и грамположительных патогенных и условно-патогенных микробов (например, к *Salmonella typhimuriumum, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*).

Критерии оценки антагонистической активности бактерий рода *Lactobacillus* приведены в таблице 5 .

Таблица 5 – Степень антагонистической активности бактерий рода *Lactobacillus*

Степень выраженности антагонистической активности	Степень ингибирования тест-штаммов, %
Очень высокая (ОВ)	80–100
Высокая (В)	60–79
Умеренная (У)	40–59
Слабая (С)	20–39
Очень слабая (ОС)	До 20
Отсутствие АА (–)	0

6 Обработка результатов анализа бифидогенных свойств *in vivo*

6.1 Для оценки воздействия функционального пищевого продукта на состояние кишечной микрофлоры используются следующие критерии:

а) активация роста/снижение содержания представителей защитной резидентной микрофлоры на 1,0 lg КОЕ/г и более;

б) отсутствие ингибирующего эффекта – содержание микроорганизмов, относящихся к резидентной микрофлоре, находится в пределах одного порядка;

в) ингибирование роста потенциально-патогенных представителей ки-шечного микробиоценоза, обладающих факторами патогенности.

6.2 Интерпретацию результатов проводят при условии соответствия показателей микробиоценоза у контрольных животных средним значениям популяционных уровней для здоровых взрослых животных данного вида (см. приложение А). Для тех видов микроорганизмов, сведения о популяционных значениях которых в таблице не приведены, значения у опытных животных сопоставляются с контрольными.

6.3 На основании результатов проведенных определений делают вывод о том, что анализируемый функциональный пищевой продукт проявляет бифидогенные свойства, если:

а) не обнаружено достоверных различий между группой, получавшей функциональный пищевой продукт и группой, получавшей функциональный пищевой ингредиент с пребиотическим действием (инулин), но обнаружены достоверные различия между группой, получавшей функциональный пищевой продукт, и контрольной группой;

б) результаты анализа свидетельствуют о сохранении популяционных соотношений анаэробного и аэробного компонента микрофлоры; стимуляции роста представителей защитной микрофлоры, особенно бактерий рода *Bifidobacterium*, и ингибирования представителей кишечного микробиоценоза, обладающих факторами патогенности; отсутствии роста патогенных микроорганизмов; сохранения

исходного уровня или повышении антагонистической активности популяций *Bifidobacterium spp.* и/или *Lactobacillus spp.*, *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью.

7 Обработка результатов

Индивидуальные результаты определения содержания анализируемых представителей микрофлоры, выраженные в десятичных логарифмах числа колониеобразующих единиц на 1 г фекалий, подвергают статистической обработке с помощью критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия между опытными и контрольной группами признаются достоверными на уровне значимости $P < 0,05$.

8 Оформление результатов

Результаты проведения анализа кишечной микрофлоры оформляют в виде таблицы (см. приложение А). Данные для контрольных животных вносят в колонку № 3, для опытных животных – в колонки № 4 и № 5, показатели различий между группами, рассчитанные согласно [7], в колонки № 6 и № 7.

Приложение А
(рекомендуемое)

Пример оформления результатов анализа функционального пищевого продукта *in vivo*

Пример оформления результатов анализа функционального пищевого продукта *in vivo* приведен в таблице А.1.

Таблица А.1 – Пример оформления результатов анализа функционального пищевого продукта *in vivo*

Представители микробиоценоза	Средние значения популяционных уровней кишечной микрофлоры у крыс, lg КОЕ/г (пределы колебаний) [8]	Результат				
		Контроль	Опыт 1 (функциональный пищевой продукт)	Опыт 2 (традиционный аналог)	*P*	
					Контроль / Опыт 1	Опыт 1 / Опыт 2
1	2	3	4	5	6	7
Анаэробные микроорганизмы	9–11					
Аэробные микроорганизмы	7–9					
Бактерии рода *Bacteroides*	8–10					
Бактерии рода *Bifidobacterium*	8–9					
Бактерии рода *Lactobacillus*	8–9					
Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе: - лактозонегативные и замедленно ферментирующие лактозу - цитратассимилирующие	5–7 3–3,5 <4					
Бактерии рода *Proteus*	<3					
Патогенные микроорганизмы (*Salmonella spp.*)	0					
Бактерии рода *Streptococcus*	7–9					
в том числе гемолитические						
Бактерии рода *Enterococcus*, в том числе гемолитические	5–6					
Бактерии рода *Staphylococcus*	5–6					
в том числе *S. aureus*	<4					
Бактерии рода *Clostridium*	2–2,8					
в том числе обладающие лецитиназной активностью						

Окончание таблицы А.1

Представители микробиоценоза	Средние значения популяционных уровней кишечной микрофлоры у крыс, lg КОЕ/г (пределы колебаний) [8]	Результат				
		Контроль	Опыт 1 (функциональный пищевой продукт)	Опыт 2 (традиционный аналог)	P	
					Контроль / Опыт 1	Опыт 1 / Опыт 2
Дрожжи и дрожжеподобные грибы	Не более 6					
Плесневые грибы						
Прочие микроорганизмы						

Приложение Б
(обязательное)

Лабораторные животные, их содержание и рацион, схема проведения анализа *in vivo*

Б.1 Лабораторные животные

Анализ проводят на крысах-самцах линии Вистар с исходной массой тела 150–160 г. После десяти дней адаптации на рационе вивария у животных контролируют массу тела и определяют динамику ее прироста. Особей, отстающих в приросте массы тела, удаляют.

Б.2 Рацион лабораторных животных

Пищевая и биологическая ценность рациона должна полностью удовлетворять физиологические потребности лабораторных животных, корма должны быть свободными от патогенных микроорганизмов и вредных примесей и не должны влиять на результаты анализа. Состав базового полусинтетического рациона приведен в таблице Б.1.

Таблица Б.1 – Состав полусинтетического рациона

Компоненты	Масса ингредиентов, г на 100 г смеси
Казеин	20
Крахмал маисовый	63,5
Масло растительное (подсолнечное)	5
Лярд	5
Солевая смесь	3,5
Сухая смесь водорастворимых витаминов	0,9
Смесь жирорастворимых витаминов (масляный раствор)	0,1
Микрокристаллическая целлюлоза	2,0

Состав смеси жирорастворимых витаминов приведен в таблице Б.2.

Таблица Б.2 – Состав смеси жирорастворимых витаминов

Витамины	Объем, $см^3$ на 100 $см^3$ смеси
Витамин Е (токоферол 50 мг/$см^3$)	10
Витамин А (ретинол-100000 и.е./$см^3$)	1,4
Витамин D (эргокальциферол 50000 и.е./$см^3$)	1,4
Рыбий жир	87,2

Состав смеси водорастворимых витаминов приведен в таблице Б.3.

Таблица Б.3 – Состав смеси водорастворимых витаминов

Витамины	Содержание, мг/100 г смеси
Тиамин гидрохлорид	500
Рибофлавин	500
Пиридоксин гидрохлорид	500
Никотинамид	2000
Кальция пантетонат	2000
Фолиевая кислота	200
Биотин	10
Менадиона натрия бисульфит (викасол) 1 %	100
Цианкобаламин	1,5
Сахароза	До 100 г

Состав солевой смеси приведен в таблице Б.4.

Таблица Б.4 – Состав солевой смеси

Минеральные соли	Содержание, г/100 г смеси
Кальций фосфорнокислый, $Ca_3(PO4)_2$	50
Натрий хлористый, NaCl	7,4
Калий лимоннокислый моногидрат, $C_6H_5O_7K_3 \times H_2O$	22
Калий сернокислый, K_2SO4	5,2
Магний окись, MgO	2,4
Марганец углекислый	0,35
Железо лимоннокислое, $C_6H_5O_7Fe$	0,6
Цинк углекислый, $ZnCO_3$	0,16
Медь углекислая	0,03
Йодистокислый калий, KIO_3	0,001
Селенистокислый натрий Na_2SeO_3	0,001
Хромокалиевые квасцы, $CrK(SO_4)_2 \times 12H_2O$	0,058
Сахароза	11,8

Б.3 Схема проведения анализа

Б.3.1 Животных делят на опытные группы, группы сравнения и контрольные группы, по 6 – 10 особей в каждой группе. Число групп определяется количеством анализируемых видов и/или доз потенциально бифидогенного функционального пищевого продукта.

Б.3.2 Опытные группы животных в ходе эксперимента подвергают воздействию тестируемого функционального пищевого продукта (продуктов, компонентов). Группы сравнения подвергают воздействию известного пребиотического компонента (инулина). Контрольные группы животных получают базовый полусинтетический рацион.

Б.3.3 Введение функционального пищевого продукта или инулина в рацион лабораторных животных осуществляется путем замещения по массовой доле кукурузного крахмала, входящего в состав стандартного полусинтетического рациона.

Б.3.4 Используется принцип кормления вволю при свободном доступе к воде.

Б.3.5 Продолжительность введения функционального пищевого продукта составляет не менее 20 дней.

Б.3.6 Ежедневно контролируют состояние животных, поедаемость корма; еженедельно – поведение, состояние шерстного покрова, наличие/отсутствие диареи, прирост массы тела.

Б.3.7 По окончании введения функционального пищевого продукта животных подвергают эвтаназии одним из разрешенных для этого способов по [7].

Б.3.8 В процессе патолого-анатомического вскрытия животных из брюшной полости выделяют слепую кишку, обвязывают лигатурой, отсекают и помещают в стерильную одноразовую посуду. Образцы хранят не более 2 ч при (4 ± 2) °С. Для анализа микрофлоры асептически отбирают содержимое слепой кишки, из которого готовят пробу для анализа.

Приложение В
(справочное)

Приготовление цитратно-фосфатных буферных растворов

В.1 В таблице В.1 приведены объемы ($см^3$) исходных растворов натрия гидрофосфата 2-водного с молярной концентрацией 0,2 моль/$дм^3$ (0,2М $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) и лимонной кислоты моногидрата с молярной концентрацией 0,1 моль/$дм^3$ (0,1 М $C_3H_4OH(COOH)_3 \cdot H_2O$), смешиванием которых получают буферный раствор с требуемым значением pH.

Таблица В.1 – Состав цитратно-фосфатных буферных растворов

Значение pH, ед.	0,2М $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (35,63 г/$дм^3$), $см^3$	(0,1 М $C_3H_4OH(COOH)_3 \cdot H_2O$) (21,01 г/$дм^3$), $см^3$
2,2	98,0	2,0
2,4	96,8	3,2
2,6	89,1	10,9
3,0	79,5	20,5
3,6	67,8	32,2
4,0	44,0	56,0
4,6	51,8	48,2
5,0	48,5	51,5
5,6	42,0	58,0
6,0	36,9	63,1
6,6	27,3	72,7
7,0	17,7	82,3

В случае отклонения значения pH буферного раствора от заданной величины (не более чем на 0,1 ед. pH) его доводят до нужной величины одним из исходных растворов.

Библиография

[1] ОСО-42-28–85 Отраслевой стандарт для визуальной оценки мутности бактериальных взвесей № 10, утвержденный ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ

[2] ВФС 42-2698–96 Временная Фармакопейная статья «О разрешении медицинского применения», утвержденная Приказом Министерства здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации от 9 июля 1996 года

[3] Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 года № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики»

[4] Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»

[5] СП 1.3.2322–08 Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 28.01.2008 г, с 01.05.2008 г.

[6] МУ 2.3.2.2789–10 Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 06.12.2010 г.

[7] Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 № 75 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»

[8] МУ 1.2.2634–10 Методические указания «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза», утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 24 мая 2010 г.

УДК 579.67:006.354 ОКС 67.220.20
67.050

Ключевые слова: функциональные пищевые продукты, бифидогенные свойства, пробиотические микроорганизмы, пребиотические вещества, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, методы *in vivo*, методы *in vitro*

Подписано в печать 25.05.2015. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 3,26. Тираж 35 экз. Зак. 1153.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru
gost.e-ecolog.ru

ОКС 67.220.20
67.050

Изменение № 1 ГОСТ Р 56201—2014 Продукты пищевые функциональные. Методы определения бифидогенных свойств

Утверждено и введено в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28.01.2020 № 17-ст

Дата введения — 2020—04—01

Титульный лист, первая страница. Наименование стандарта после слов «**Продукты пищевые**» дополнить словами «**специализированные и**».

Первая страница. Наименование стандарта на английском языке. Заменить слова: «Functional food products» на «Functional foods and foods for special dietary uses».

Раздел 1 после слов «распространяется на» дополнить словами: «специализированные и».

Раздел 2 изложить в новой редакции:

«В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 3 Перчатки хирургические резиновые. Технические условия

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 245 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 490 Добавки пищевые. Кислота молочная Е270. Технические условия

ГОСТ 1129 Масло подсолнечное. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 2768 Ацетон технический. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3652 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 4145 Реактивы. Калий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4162 Реактивы. Квасцы хромокалиевые. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4526 Реактивы. Магний оксид. Технические условия

ГОСТ 5538 Реактивы. Калий лимоннокислый 1-водный. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5833 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. *D*-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6292 Крупа рисовая. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7205 Реактивы. Марганец (II) углекислый основной, водный. Технические условия

ГОСТ 8927 Реактивы. Медь (II) углекислая основная. Технические условия

ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9393 Жир ветеринарный из рыбы и морских млекопитающих. Технические условия

ГОСТ 9412 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 10444.1 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 10444.11 (ISO 15214:1998) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10929 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13646 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия

ГОСТ 13739 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 19881 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 20015 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 21239 (ИСО 7741—86) Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21240 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21400 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 22280 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26670 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 27547 Витамин Е (α-токоферола ацетат) микрогранулированный кормовой. Технические условия

ГОСТ 27987 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия

ГОСТ 28489 Микроскопы световые. Термины и определения

ГОСТ 28566 Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31598 (EN 285:1996) Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ 31689 Казеин. Технические условия

ГОСТ 31725 Добавки пищевые. Натрия фосфаты Е339. Общие технические условия

ГОСТ 31747 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 32007 Добавки пищевые. Кальция фосфаты Е341. Общие технические условия

ГОСТ 32779 Добавки пищевые. Кислота сорбиновая Е200. Технические условия

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ ISO 29981 Продукты молочные. Подсчет презумптивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37 °С

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р ЕН 13060 Стерилизаторы паровые малые

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку».

Пункт 3.2 после слова «Способность» дополнить словами: «специализированных и».

Раздел 4. Наименование. Заменить слово: «**измерения**» на «**измерений**».

Подраздел 4.1. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 51935» на «ГОСТ 31598».

Подраздел 4.3. Заменить ссылки: «ГОСТ Р 51652» на «ГОСТ 5962», «ГОСТ ISO 11133-1» на «ГОСТ ISO 11133», исключить ссылку: «и ГОСТ ISO 11133-2».

Подпункты 4.6.9.1, 4.6.11.2. Заменить ссылку: «ГОСТ ISO 11133-1» на «ГОСТ ISO 11133».

Пункт 5.1.1. Первый абзац после слов «бифидогенной активности» дополнить словами: «специализированных и»; заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

второй абзац. Заменить слова: «функциональные пищевые» на «анализируемые»;

третий абзац. Исключить после слова «анализируемый» слова: «функциональный пищевой»; заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

четвертый абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

пятый абзац. После слов «**суточная доза**» дополнить словами: «**специализированного и**»; после слов «**раствора (взвеси)**» заменить слова: «**функционального пищевого**» на «**анализируемого**»;

седьмой абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.1.2. Четвертый, пятый, шестой, седьмой, восьмой, девятый абзацы. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.1.3. Второй абзац. Исключить слова: «функционального пищевого»;

третий и четвертый абзацы. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.2.1. Первый абзац после слов «на изучении воздействия» дополнить словами: «специализированных и»;

примечание 2 после слова «Воздействие» дополнить словами: «специализированного и».

Пункт 5.2.2. Третий абзац. Заменить слова: «тестируемый функциональный пищевой» на «анализируемый специализированный и функциональный»; «без функционального» на «без специализированного и функционального»;

шестой абзац после слова «содержащей» дополнить словами: «специализированный и», заменить слова: «тестируемый функциональный пищевой» на «анализируемый специализированный и функциональный»; «без функционального» на «без специализированного и функционального».

Пункт 5.2.3. Наименование после слова «**воздействия**» дополнить словами: «**специализированного и**»;

первый абзац после слова «Воздействие» дополнить словами: «специализированного и».

Пункт 5.2.4. Первый абзац после слов «бифидогенных свойств» дополнить словами: «специализированного и»; заменить (после слов «индуцирован присутствием») слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

второй абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.3.1. Первый абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Подпункт 5.3.2.1. Первый абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Подпункт 5.3.2.4 после слов «***2,0 × 10^9 КОЕ/г.***» дополнить абзацем:

«Суммарное содержание аэробных и анаэробных микроорганизмов рассчитывают путем суммирования общего числа аэробных и общего числа анаэробных микроорганизмов, вычисленных по формуле (2)»;

дополнить абзацем: «Относительное количество (доли) определяемых групп, родов, видов микроорганизмов (по отношению к суммарному содержанию аэробных и анаэробных микроорганизмов) вычисляют путем деления количества этих микроорганизмов, выраженного в lg КОЕ/г, на суммарное содержание аэробных и анаэробных микроорганизмов, выраженное в lg КОЕ/г».

Подпункт 5.3.3.2 после слов «Для оценки влияния» дополнить словами: «специализированных и».

Пункт 6.1. Второй, третий, четвертый абзацы изложить в новой редакции:

«а) активация роста/снижение содержания представителей защитной резидентной микрофлоры на 1,0 lg КОЕ/г и более;

б) отсутствие ингибирующего эффекта — содержание микроорганизмов, относящихся к резидентной микрофлоре, находится в пределах одного порядка;

в) изменение относительных количеств (долей) представителей защитной резидентной и транзиторной микрофлоры при сопоставлении с общим числом аэробных и анаэробных микроорганизмов;

г) ингибирование роста потенциально-патогенных представителей кишечного микробиоценоза, обладающих факторами патогенности».

Пункт 6.3. Первый абзац после слова «анализируемый» дополнить словами: «специализированный и»;

второй абзац. Заменить слова: «функциональный пищевой продукт» на «анализируемый продукт».

Раздел 7 после слов «числа колониеобразующих единиц на 1 г фекалий,» дополнить словами: «а также относительного количества (долей) анализируемых представителей микрофлоры».

Приложение А. Наименование после слов «**результатов анализа**» дополнить словами: «**специализированного и**»;

таблица А.1. Графа 4 «Опыт 1 (функциональный пищевой продукт)». Заменить слова: «(функциональный пищевой продукт)» на «(анализируемый продукт)».

Приложение Б. Пункты Б.3.1, Б.3.3, Б.3.5, Б.3.7. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

пункт Б.3.2. Заменить слова: «тестируемого функционального пищевого» на «анализируемого».

Код ОКС. Заменить: «67.220.20» на «67.040».

Ключевые слова. Заменить слово: «функциональные» на «специализированные и функциональные».

(ИУС № 4 2020 г.)

ОКС 67.220.20
67.050

Изменение № 1 ГОСТ Р 56201—2014 Продукты пищевые функциональные. Методы определения бифидогенных свойств

Утверждено и введено в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28.01.2020 № 17-ст

Дата введения — 2020—04—01

Титульный лист, первая страница. Наименование стандарта после слов «**Продукты пищевые**» дополнить словами «**специализированные и**».

Первая страница. Наименование стандарта на английском языке. Заменить слова: «Functional food products» на «Functional foods and foods for special dietary uses».

Раздел 1 после слов «распространяется на» дополнить словами: «специализированные и».

Раздел 2 изложить в новой редакции:

«В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 3 Перчатки хирургические резиновые. Технические условия

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 245 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 490 Добавки пищевые. Кислота молочная Е270. Технические условия

ГОСТ 1129 Масло подсолнечное. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2493 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 2768 Ацетон технический. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3652 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 4145 Реактивы. Калий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4162 Реактивы. Квасцы хромокалиевые. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4526 Реактивы. Магний оксид. Технические условия

ГОСТ 5538 Реактивы. Калий лимоннокислый 1-водный. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5833 Реактивы. Сахароза. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. *D*-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6292 Крупа рисовая. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7205 Реактивы. Марганец (II) углекислый основной, водный. Технические условия

ГОСТ 8927 Реактивы. Медь (II) углекислая основная. Технические условия

ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9393 Жир ветеринарный из рыбы и морских млекопитающих. Технические условия

ГОСТ 9412 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 10444.1 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 10444.11 (ISO 15214:1998) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 10929 Реактивы. Водорода пероксид. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13646 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия

ГОСТ 13739 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 19881 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 20015 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 21239 (ИСО 7741—86) Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21240 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21400 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 22280 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26670 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 27547 Витамин Е (α-токоферола ацетат) микрогранулированный кормовой. Технические условия

ГОСТ 27987 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия

ГОСТ 28489 Микроскопы световые. Термины и определения

ГОСТ 28566 Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31598 (EN 285:1996) Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ 31689 Казеин. Технические условия

ГОСТ 31725 Добавки пищевые. Натрия фосфаты Е339. Общие технические условия

ГОСТ 31747 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 32007 Добавки пищевые. Кальция фосфаты Е341. Общие технические условия

ГОСТ 32779 Добавки пищевые. Кислота сорбиновая Е200. Технические условия

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ ISO 29981 Продукты молочные. Подсчет презумптивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37 °С

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р ЕН 13060 Стерилизаторы паровые малые

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку».

Пункт 3.2 после слова «Способность» дополнить словами: «специализированных и».

Раздел 4. Наименование. Заменить слово: «**измерения**» на «**измерений**».

Подраздел 4.1. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 51935» на «ГОСТ 31598».

Подраздел 4.3. Заменить ссылки: «ГОСТ Р 51652» на «ГОСТ 5962», «ГОСТ ISO 11133-1» на «ГОСТ ISO 11133», исключить ссылку: «и ГОСТ ISO 11133-2».

Подпункты 4.6.9.1, 4.6.11.2. Заменить ссылку: «ГОСТ ISO 11133-1» на «ГОСТ ISO 11133».

Пункт 5.1.1. Первый абзац после слов «бифидогенной активности» дополнить словами: «специализированных и»; заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

второй абзац. Заменить слова: «функциональные пищевые» на «анализируемые»;

третий абзац. Исключить после слова «анализируемый» слова: «функциональный пищевой»; заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

четвертый абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

пятый абзац. После слов «**суточная доза**» дополнить словами: «**специализированного и**»; после слов «**раствора (взвеси)**» заменить слова: «**функционального пищевого**» на «**анализируемого**»;

седьмой абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.1.2. Четвертый, пятый, шестой, седьмой, восьмой, девятый абзацы. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.1.3. Второй абзац. Исключить слова: «функционального пищевого»;

третий и четвертый абзацы. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.2.1. Первый абзац после слов «на изучении воздействия» дополнить словами: «специализированных и»;

примечание 2 после слова «Воздействие» дополнить словами: «специализированного и».

Пункт 5.2.2. Третий абзац. Заменить слова: «тестируемый функциональный пищевой» на «анализируемый специализированный и функциональный»; «без функционального» на «без специализированного и функционального»;

шестой абзац после слова «содержащей» дополнить словами: «специализированный и», заменить слова: «тестируемый функциональный пищевой» на «анализируемый специализированный и функциональный»; «без функционального» на «без специализированного и функционального».

Пункт 5.2.3. Наименование после слова «**воздействия**» дополнить словами: «**специализированного и**»;

первый абзац после слова «Воздействие» дополнить словами: «специализированного и».

Пункт 5.2.4. Первый абзац после слов «бифидогенных свойств» дополнить словами: «специализированного и»; заменить (после слов «индуцирован присутствием») слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

второй абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Пункт 5.3.1. Первый абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Подпункт 5.3.2.1. Первый абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого».

Подпункт 5.3.2.4 после слов «***2,0 × 10^9 КОЕ/г.***» дополнить абзацем:

«Суммарное содержание аэробных и анаэробных микроорганизмов рассчитывают путем суммирования общего числа аэробных и общего числа анаэробных микроорганизмов, вычисленных по формуле (2)»;

дополнить абзацем: «Относительное количество (доли) определяемых групп, родов, видов микроорганизмов (по отношению к суммарному содержанию аэробных и анаэробных микроорганизмов) вычисляют путем деления количества этих микроорганизмов, выраженного в lg КОЕ/г, на суммарное содержание аэробных и анаэробных микроорганизмов, выраженное в lg КОЕ/г».

Подпункт 5.3.3.2 после слов «Для оценки влияния» дополнить словами: «специализированных и».

Пункт 6.1. Второй, третий, четвертый абзацы изложить в новой редакции:

«а) активация роста/снижение содержания представителей защитной резидентной микрофлоры на 1,0 lg КОЕ/г и более;

б) отсутствие ингибирующего эффекта — содержание микроорганизмов, относящихся к резидентной микрофлоре, находится в пределах одного порядка;

в) изменение относительных количеств (долей) представителей защитной резидентной и транзиторной микрофлоры при сопоставлении с общим числом аэробных и анаэробных микроорганизмов;

г) ингибирование роста потенциально-патогенных представителей кишечного микробиоценоза, обладающих факторами патогенности».

Пункт 6.3. Первый абзац после слова «анализируемый» дополнить словами: «специализированный и»;

второй абзац. Заменить слова: «функциональный пищевой продукт» на «анализируемый продукт».

Раздел 7 после слов «числа колониеобразующих единиц на 1 г фекалий,» дополнить словами: «а также относительного количества (долей) анализируемых представителей микрофлоры».

Приложение А. Наименование после слов «**результатов анализа**» дополнить словами: «**специализированного и**»;

таблица А.1. Графа 4 «Опыт 1 (функциональный пищевой продукт)». Заменить слова: «(функциональный пищевой продукт)» на «(анализируемый продукт)».

Приложение Б. Пункты Б.3.1, Б.3.3, Б.3.5, Б.3.7. Заменить слова: «функционального пищевого» на «анализируемого»;

пункт Б.3.2. Заменить слова: «тестируемого функционального пищевого» на «анализируемого».

Код ОКС. Заменить: «67.220.20» на «67.040».

Ключевые слова. Заменить слово: «функциональные» на «специализированные и функциональные».

(ИУС № 4 2020 г.)

gost.e-ecolog.ru