

**Богдан ГОЛУБ,
Світлана ДАНИЛЕНКО,
Ганна РУДАВСЬКА**

ФОРМУВАННЯ ЛІКУВАЛЬНО- ПРОФІЛАКТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИНБІОТИЧНИХ МОЛОЧНИХ НАПОЇВ

Розглянуто сучасні тенденції розвитку ринку про- та синбіотичних харчових продуктів. Охарактеризовано сучасні підходи до формування оздоровчих властивостей про- та синбіотичних молочних напоїв. Наведено результати клінічної апробації розроблених авторами синбіотичних ферментованих молочних напоїв.

Ключові слова: пробіотики, синбіотики, біфідобактерії, лікувально-профілактичні властивості, ферментовані молочні напої.

Голуб Б., Даниленко С., Рудаковская А. Формирование лечебно-профилактических свойств синбиотических молочных напитков. Рассмотрены современные тенденции развития рынка про- и синбиотических пищевых продуктов. Дана характеристика современных тенденций и подходов к формированию оздоровительных свойств про- и синбиотических напитков. Приведены результаты клинической апробации разработанных авторами синбиотических ферментированных напитков.

Ключевые слова: пробиотики, синбиотики, бифидобактерии, оздоровительно-профилактические свойства, ферментированные молочные напитки.

Постановка проблеми. Харчові продукти є найважливішою частиною ринку споживних товарів. Вони забезпечують задоволення первинних потреб людини (так звана "піраміда потреб за Маслоу"). У сучасному світі ці потреби зазнали кардинальних змін, які зумовлено соціально-економічними умовами та їхньою диференціацією у різних країнах світу й стрімким розвитком природничих наук, що уможливив удосконалити знання про особливості взаємозв'язку людини та довкілля. Основні з них стосуються механізму фізіологічних процесів в організмі людини, природи й перебігу так званих "хвороб цивілізації", формування харчового статусу споживачів тощо.

Ключовим напрямком поліпшення стану здоров'я населення є забезпечення повноцінного, адекватного існуючим умовам харчування, яке має забезпечувати необхідні організму нутрієнти відповідно до стану здоров'я людини, стресового навантаження, екологічних умов існування. При посиленні надходження до організму забруднювальних речовин із токсичними властивостями, що можуть призводити до негативних наслідків як у короткостроковій, так і у віддаленій пер-

спективі, важливим є і обмеження їх надходження, і нейтралізація їхнього впливу на організм. Це зумовлює поступову зміну уявлень про "традиційну їжу". Все більшу частку в харчуванні сучасної людини займають продукти зі зміненою чи посиленою харчовою цінністю. Нині точаться суперечки щодо категоріального апарату в цій царині: чи вважати такі продукти функціональними, що таке функціональність харчових продуктів, які продукти вважати функціональними? Щодо необхідності їхнього впровадження й використання думки спеціалістів збігаються – такі продукти є невід'ємною часткою раціону харчування сучасної людини.

Найбільш динамічним сегментом ринку харчових продуктів за останні десятиріччя є сегмент біотичних продуктів (пробіотики, синбіотики, пребіотики). Частка нових асортиментних позицій пробіотиків у 2010, 2011 та 2012 рр. становила 19, 22 та 25 % відповідно. Із них майже 80 % припадало на сегмент молочних продуктів, 10 % – на дитяче харчування, 3–4 % – на напої, включаючи соковмісні. У сегменті про- та синбіотичних молочних продуктів найбільшу частку становили йогурти й інші кисломолочні напої. Із 2008-го по 2012 р. спостерігається поступовий перерозподіл ринку між так званими питними й густими йогуртами: частка нових асортиментних позицій перших у загальному асортименті скоротилася на 12 % (до 42 %), а густих зросла на 8 % (до 48 %). Найдинамічніше оновлення асортименту відбувається в країнах ЄС та Азії (переважно в Японії та Китаї) – ріст нових найменувань на 34 та 44 % відповідно від загальної кількості [1–3].

Про- та синбіотичні харчові продукти позиціонуються як такі, що мають оздоровчі та лікувально-профілактичні властивості. Наявність доведеного корисного впливу на організм людини, пов'язаного з ідентифікованим компонентом харчового продукту (чітко визначений штам, хімічна сполука рецептурного інгредієнта тощо), є обов'язковою умовою впровадження його як функціонального на ринок країн ЄС (оздоровчі вимоги – *Health claims*), що стало одним із чинників уповільнення зростання обсягів європейського ринку таких продуктів. У Китаї, Японії та більшості країн Азії наявність пробіотичних штамів уможливорює позиціонувати продукт як функціональний. У США відсутні спеціальні вимоги до пробіотичних харчових продуктів. Однак наведення певних фізіологічних властивостей на маркуванні вимагає їх підтвердження [4].

У представлених на світовому ринку пробіотичних харчових продуктах переважають оздоровчі вимоги, пов'язані з впливом на травну та імунну системи організму людини (задекларовані в 25 та 11 % нових асортиментних позицій на світовому ринку в період 2010–2012 рр.). Крім того, для споживачів важливими є низька енергетична цінність, зниження або відсутність харчових алергенів, збагачення вітамінно-мінеральними комплексами, відсутність клейковини (пребіотична складова) тощо [4].

Характерною особливістю синбіотичних молочних напоїв є вміст пребіотиків і пробіотиків, що збільшує виживання, полегшує адаптацію та колонізацію останніми кишечнику людини. Згідно з теорією адекватного харчування акад. А. М. Уголева в організмі людини є декілька шляхів засвоєння (асиміляції) поживних речовин – порожнинне, клітинне, мембранне, частина з цих речовин є продуктами життєдіяльності кишкової мікрофлори. Важливо, щоб клітини організму людини та мікроорганізми не вступали в конкуренцію за поживні речовини під час їхньої асиміляції. Пребіотики повинні стимулювати життєдіяльність корисної мікрофлори, але не повинні активно асимілюватись клітинами організму людини. У такому випадку зберігається достатня кількість поживних речовин для корисної мікрофлори. Цим вимогам якнайкраще задовольняють фруктоолігосахариди. Саме вони займають ліву частку в асортименті пребіотичних інгредієнтів і продуктів. Ферментування молочних продуктів із пребіотиками показує кращий результат подальшої адаптації та колонізації пробіотиками кишечнику людини, ніж внесення пребіотиків після ферментації. Пробиотичні мікроорганізми концентруються навколо пребіотичних волокон, утворюючи скупчення на зразок біоплівки. У такому вигляді вони значно підвищують опірність до несприятливих чинників, зокрема підвищеної кислотності у ферментованому продукті та шлунковому соку. Під час колонізації вони швидше проходять лаг-фазу розвитку колонії, оскільки при ферментації їхня ферментна система була адаптована до пребіотичної речовини.

Літературний огляд свідчить про значну увагу до вивчення пребіотичного ефекту чистих речовин, але водночас існує обмаль результатів використання в синбіотичних композиціях природних інгредієнтів, які містять пребіотичні речовини. Відповідно обговорення корисного фізіологічного впливу синбіотичних продуктів на їхній основі теж обмежене. Нами досліджено наявність лікувально-профілактичних властивостей синбіотичних молочних напоїв із використанням доступної в Україні рослинної сировини – кореневого цикорію (*Cichorium intybus L.*). Його корисний вплив на розвиток пробіотичної біфідофлори доведено в попередній публікації [5].

Мета дослідження – виявлення та вивчення лікувально-профілактичних властивостей розробленого синбіотичного молочного напою "Біфісин" за результатами клінічної апробації.

Матеріали та методи. Розроблений авторами [5] ферментований біфідобактеріями синбіотичний молочний напій "Біфісин", для виготовлення якого використовується двокомпонентна закваска – *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) та *Bifidobacterium longum* (VKPM-1514), – незбиране коров'яче молоко, сухе коров'яче молоко, водний екстракт цикорію кореневого, чисті культури біфідобактерій. Напій має жирність 2.5 % і упакований у "пюр-пак" із комбінованого матеріалу об'ємом 0.5 дм³.

Монокультура *Bifidobacterium longum* – закваска прямого внесення, культура вітчизняної селекції, може використовуватись у виробництві функціональних молочних продуктів. Її перевагою є швидка адаптація в молочно-цикорній суміші та інтенсивне накопичення кількості колонієутворювальних одиниць. Монокультура *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* також закваска прямого внесення, яка використовується для виробництва кисломолочних напоїв і є однією з найпоширеніших заквасок у світі для ферментації молочної основи. Її перевагою є високі органолептичні та реологічні властивості утворюваного згустку. Обидва штами мають високу антагоністичну активність до бактерій родів *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*.

Для ферментації використано молочно-рослинну основу з коров'ячого молока та водного екстракту цикорію з масовою часткою сухих речовин 70 %, який вводиться в кількості 15–17 %. Ферментація та дослідження готового напою здійснено згідно із затвердженими й рекомендованими методиками [6–8].

Клінічну апробацію проведено Науково-дослідним інститутом фітотерапії Ужгородського національного університету під керівництвом проф. О. М. Ганич. Під спостереженням перебувало 35 осіб у дослідній групі та 29 – у контрольній. "Біфісин" застосовано як додаток до основного лікування та харчування після їжі двічі на день по 100 см³ за прийом протягом 25-ти діб для дослідної групи. Контрольна група отримувала кисломолочний напій "Закваска Яготинська".

До груп включено особи віком 18–50 років. У дослідній групі було 29 жінок та 6 чоловіків, у контрольній – 22 та 7 відповідно. У 15-ти осіб контрольної групи діагностовано хронічний гастродуоденіт, у 5-ти – ентероколіт, у 7-ми – гіперацидний гастрит. У дослідній групі в 7-ми осіб діагностовано гепатохолецистит, у 2-х – ентероколіт, у 10-ти – хронічний гастродуоденіт.

Перед початком, протягом і по завершенню курсу проводилися біохімічні, імунологічні та біохімічні дослідження.

Випадків непереносимості, відмов від приймання, алергічних реакцій на досліджуваний напій виявлено не було.

Клінічну ефективність "Біфісину" оцінювали за динамікою змін загального стану осіб дослідної групи, апетиту, убуванням основних клінічних симптомів захворювань, складу мікрофлори кишечника.

Результати досліджень. Клінічною апробацією кисломолочного продукту "Біфісин" встановлено його високі органолептичні властивості, фізико-хімічні параметри, безпечність і значну терапевтичну ефективність (табл. 1).

Продукт проявляє виражений стимулювальний вплив на апетит, сприяє нормалізації секреторної та кислотоутворювальної функцій шлунка, кишкового травлення, підвищенню вітамінної забезпеченості організму, нормалізації анаболічних процесів.

Встановлено значну ефективність "Біфісину" при лікуванні різних за етіологією кишкових дисбактеріозів. Переважно це пов'язано

з помітною антагоністичною активністю мікрофлори "Біфісину" відносно широкого кола патогенних і умовно-патогенних ентеробактерій, гнильних мікроорганізмів, стафілококів, грибів та інших збудників захворювань травного тракту.

Таблиця 1

Результати оцінки якості та безпечності напою "Біфісин"

| Показник | Характеристика та значення показників |
|--|--|
| Органолептичні властивості | Напій світло-коричневого кольору, однорідної консистенції, без відділення сироватки та виділення пухирців газу, смак приємний гіркуватий, запах чистий кисломолочний |
| Кислотність титрована, °Т | 86 ± 5 |
| Кислотність активна, рН | 4.9 ± 1 |
| Масова частка жиру, % | 2.7 ± 1 |
| Масова частка білка, % | 2.9 ± 2 |
| Фосфатаза | Відсутня |
| Кількість біфідобактерій, КУО/1 см ³ | 1.1 · 10 ⁸ |
| Патогенні мікроорганізми, в т. ч. бактерії роду <i>Salmonella</i> , у 25 г | Відсутні |
| БГКП (коліформи) у 0.1 см ³ | |
| Плісеневі гриби та дріжджі в 1 см ³ | |

При використанні "Біфісину" спостерігаються кількісні та якісні зміни кишкової мікрофлори в бік пригнічення умовно-патогенних мікроорганізмів і збільшення концентрації біфідобактерій, що також супроводжується зменшенням антигенного навантаження на організм і зменшенням ступеню сенсibilізації організму.

У дослідній групі в 30-ти осіб на 20-ту добу прийому "Біфісину" відчутно поліпшилось загальне самопочуття, у 22-х – на 18–20-ту добу істотно знизилася больова відчуття у черевній порожнині після приймання їжі, у 11-ти осіб на 14-ту добу нормалізувалося випорожнення, у 32-х – на 16–20-ту добу зникли ознаки здуття черева, у 8-ми осіб на 23–25-ту добу зникли ознаки глоситу. В усіх осіб дослідної групи відзначено позитивну динаміку клінічних симптомів.

Ферментативна активність шлунку проявилася в поліпшенні репаративних процесів у його слизовій оболонці. У осіб дослідної групи відмічено зменшення гіперемії, загального набрякання слизової, виразності ерозивного процесу. Лише загальна динаміка відновлення стану слизової шлунку показала необхідність вживання напою триваліший період, ніж час проведених досліджень.

На початку дослідження зафіксовано зниження фагоцитарної активності осіб як контрольної, так і дослідної груп. Прийом "Біфісину" позитивно позначився на зростанні загального імунітету в осіб дослідної групи. Зокрема, спостерігалась активація фагоцитозу та зростання активності нейтрофілів периферичної крові. Упродовж приймання "Біфісину" фагоцитарний індекс достовірно виріс у осіб дослідної групи до нормального значення (табл. 2).

Таблиця 2

Динаміка активності лізоциму та показника фагоцитарної активності нейтрофілів дослідної та контрольної груп

| Показник | Дослідна група | | Контрольна група | |
|-------------------------|-----------------|-------------|------------------|--------------|
| | до | після | до | після |
| | приймання напою | | | |
| Фагоцитарний індекс | 2.21 ± 0.23 | 4.54 ± 0.5 | 2.19 ± 0.25 | 2.7 ± 0.32 |
| Процент фагоцитозу | 64.2 ± 2.1 | 78.2 ± 2.2 | 65.7 ± 5.2 | 67.1 ± 3.8 |
| Індекс перетравлювання | 1.5 ± 0.11 | 2.68 ± 0.47 | 1.4 ± 0.1 | 1.7 ± 0.7 |
| Процент перетравлювання | 54.1 ± 0.5 | 79.1 ± 3.1 | 57.2 ± 1.8 | 65.21 ± 1.53 |
| Рівень лізоциму | 7.21 ± 1.21 | 11.5 ± 1.4 | 7.44 ± 1.23 | 7.49 ± 1.51 |

Результати показують достовірне зростання фагоцитарної активності в осіб дослідної групи та помітну тенденцію до зростання в осіб контрольної групи. Завершеність стадії фагоцитозу залежить від активності лізоциму, котрий приймає участь у внутрішньоклітинному перетравлюванні. Його активність відновилася до нормального значення лише в осіб дослідної групи. У осіб контрольної групи завершеність фагоцитозу залишилася на низькому рівні при помітній активізації інкорпорації мікроорганізмів фагоцитами.

У табл. 3 наведено результати дослідження складу мікрофлори кишечника осіб дослідної та контрольної груп до і після приймання напоїв.

Таблиця 3

Динаміка мікрофлори кишечника дослідної та контрольної груп

| Мікроорганізми | Кількість мікроорганізмів, lg КУО/г | | | |
|------------------------|-------------------------------------|-------|------------------|-------|
| | дослідна група | | контрольна група | |
| | до | після | до | після |
| | приймання напою | | | |
| Біфідобактерії | 5.815 | 7.417 | 5.743 | 5.912 |
| Лактобактерії | 4.611 | 6.958 | 4.578 | 5.544 |
| Кишкові палички: | | | | |
| – лактозопозитивні | 4.111 | 5.659 | 4.567 | 4.710 |
| – лактозонегативні | 7.519 | 6.888 | 7.312 | 7.010 |
| – лактозопослаблені | 7.545 | 6.329 | 7.442 | 7.376 |
| – β-гемолітичні | 5.004 | 3.111 | 4.998 | 3.270 |
| Ентерококи | 4.651 | 4.287 | 4.615 | 4.213 |
| Стафілококи: | | | | |
| – патогенні | 4.890 | 3.558 | 4.513 | 4.001 |
| – умовно-патогенні | 5.380 | 3.222 | 5.681 | 4.871 |
| Дріжджі <i>Candida</i> | 3.273 | 3.117 | 3.301 | 3.254 |
| Протей | 4.531 | 2.860 | 4.925 | 4.462 |

Результати оцінки динаміки складу мікрофлори кишечника свідчать про достовірне зниження патогенної та умовно-патогенної мікрофлори в дослідній групі на фоні підвищення кількості біфідобактерій та лактобактерій. При цьому інтенсивність росту лактобактерій без введення їх до складу напою свідчить про активність пребіотичної складової продукту.

У контрольній групі зафіксовано достовірне зниження лише гемолітичних форм кишкової палички та протею. Виразного ефекту застосування напою на зниження мікробних асоціацій умовно-патогенної мікрофлори не виявлено. Однак внутрішньовидовий аналіз показав зниження слабо гліколітичних бактерій – гемолітичної кишкової палички та протея. Водночас відчутним було зниження лактозоферментуючої кишкової палички, що уможливило зробити висновок про характер позитивного впливу використаної біфідофлори на склад кишкової мікрофлори. Головним чином він забезпечується конкуренцією за поживні речовини та пониженням рН у місцях локалізації мікрофлори.

Висновки. Кисломолочний напій "Біфісин" – вискооефективний оздоровчий продукт, який істотно перевершує за профілактичними властивостями кисломолочні продукти традиційного асортименту: добре переноситься організмом, не викликає алергічних реакцій, має виразний клінічний ефект при кишкових дисфункціях.

"Біфісин" сприяє усуненню інтоксикаційного, дискінетичного, діарейного синдромів, підвищенню апетиту, нормалізації основних функцій шлунку (секрето- і кислотоутворювання), кишкового травлення, поліпшенню вітамінної забезпеченості організму, нормалізації кишкової мікрофлори, активізації імунної системи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Агенція новин молочної промисловості DairyReporter.com.* — Режим доступу : <http://www.dairyreporter.com/Markets/Global-digestive-breakdown-Pre-probiotic-yoghurt-still-number-2-in-functional-food>.
2. *Агенція новин молочної промисловості DairyReporter.com.* — Режим доступу : <http://www.dairyreporter.com/Markets/Global-probiotics-market-to-grow-6.8-annually-until-2018>.
3. *Агенція новин молочної промисловості DairyReporter.com.* — Режим доступу : <http://www.dairyreporter.com/Markets/Global-probiotic-market-to-add-50-to-33bn-by-2018-Analyst>
4. *Ohr Linda Milo.* Health Benefits of Probiotics and Prebiotics / Linda Milo Ohr // Food Technology. — 2010. — N 3. — Way of access : <http://www.ift.org/food-technology/past-issues/2010/march/columns/nutraceuticals.aspx?page=viewall>.
5. *Голуб Б.* Формування реологічних властивостей синбіотичних молочних напоїв під впливом пробіотичних заквасок різного складу / Б. Голуб, С. Даниленко, Г. Рудавська // Міжнар. наук.-практ. журн. "Товари і ринки". — 2010. — № 2. — С. 55—60.
6. *МВК 10.10.2.2.-119–2005* Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах. Методичні вказівки // Санітарний лікар України. —

- № 1—4. — 2005 р. — Режим доступу : http://uazakon.com/documents/date_8w/pg_iacjwb.htm.
7. Культури молочнокислих заквасок. Визначання видового складу (IDF 149A:1997, IDT) : ДСТУ IDF 149A:2003 — [Чинний від 2003—08—01]. — К. : Держспоживстандарт України 2003. — 18 с.
 8. Крусь Г. Н. Методы исследования молока и молочных продуктов / Г. Н. Крусь, В. М. Шалыгина, З. В. Волокитина. — М. : Колос. — 2000. — 367 с.

Стаття надійшла до редакції 28.04.2014.

Holub B., Danylenko S., Rudavska A. Synbiotic dairy beverages' health claims forming.

Background. During last decades the most dynamic share of food market is a share of biotic foods (probiotics, synbiotics and prebiotics). New probiotic launches during 2010–2012 years were 19, 22 and 25 % respectively. Dairy foods took 80 % in those launches. As presented on the world market dominate probiotic food health claims related to the impact on the digestive and immune system of the human body (declared at 25 % and 11 % of new product lines position in the world market during the period 2010–2012).

Material and methods. New fermented symbiotic dairy drink *Bifisyn* was developed by authors. It was cultured by bi-strain starter – *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB-12 and *Bifidobacterium longum* VKPM-1514 (Institute of food recourses of Ukrainian Academy of Agricultural Science). The drink is based on dairy foundation with water extract of root chicory and bifida bacteria. It's a full-fat drink (2.5 %).

Clinical testing was performed by Research Phototherapy Institute of National University of Uzhgorod under the direction of Prof. O. M. Ganych. Clinical effectiveness of *Bifisyn* was evaluated by dynamic of general condition of testing group, their appetite, decreasing of main disease clinical symptoms, feces condition. Also intestine micro flora content dynamics was evaluated.

Results. It was established that *Bifisyn* is effective for disbacteriosis of different origin treatment. This is mainly connected with antagonistic activity of *Bifisyn* micro flora against wide range of pathogenic and opportunistic enterobacteria, putrefactive microorganisms, staphylococci's, yeasts and other digestive disorders and diseases causative agents. Analyze of species showed tendency to decreasing low-glycolytic bacteria – hemolytic *E. coli* and *Proteus*. At the same time tangible decreasing of lactose-fermented coliforms was showed. These results allow to suppose positive effect of used Bifidobacteria onto intestine microbiosis. Mainly it was caused by nutrient competition and decreasing of pH in microflora habitation places.

Conclusion. Fermented dairy drink *Bifisyn* highly exceeds traditional cultured dairy products by prophylactic features. Human organism takes the drink well. It causes no allergy. The drink has tangible clinical effect in intestine disorders. *Bifisyn* favors elimination of intoxication, dyskinetic and diarrhea effects. Also it stimulates appetite, normalizes main intestine functions (secretion and acid formation), intestine digestion. As well it improves vitamin supplying, microbiotic composition, immune system activation.

Keywords: probiotic, synbiotic, bifidobacteria, medical and preventative qualities, fermented dairy drinks.

REFERENCES

1. *Agencija novyn molochnoi' promyslovosti DairyReporter.com.* — Rezhym dostupu : <http://www.dairyreporter.com/Markets/Global-digestive-breakdown-Pre-probiotic-yoghurt-still-number-2-in-functional-food>.

2. *Agencija novyn molochnoi' promyslovosti DairyReporter.com.* — Rezhym dostupu : <http://www.dairyreporter.com/Markets/Global-probiotics-market-to-grow-6.8-annually-until-2018>.
3. *Agencija novyn molochnoi' promyslovosti DairyReporter.com.* — Rezhym dostupu : <http://www.dairyreporter.com/Markets/Global-probiotic-market-to-add-50-to-33bn-by-2018-Analyst>
4. *Ohr Linda Milo. Health Benefits of Probiotics and Prebiotics / Linda Milo Ohr // Food Technology.* — 2010. — N 3. — Way of access : <http://www.ift.org/food-technology/past-issues/2010/march/columns/nutraceuticals.aspx?page=viewall>.
5. *Golub B. Formuvannja reologichnyh vlastyvostej synbiotychnyh molochnyh napoi'v pid vplyvom probiotychnyh zakvasok riznogo skladu / B. Golub, S. Danylenko, G. Rudavs'ka // Mizhnar. nauk.-prakt. zhurn. "Tovary i rynky".* — 2010. — № 2. — S. 55—60.
6. *MVK 10.10.2.2.-119–2005 Vyznachennja kil'kosti bifidobakterij u kyslomolochnyh produktah. Metodychni vказivky // Sanitarnyj likar Ukrainy.* — № 1—4. — 2005 r. — Rezhym dostupu : http://uazakon.com/documents/date_8w/pg_iacjwb.htm.
7. *Kul'tury molochnokyslyh zakvasok. Vyznachannja vydovogo skladu (IDF 149A:1997, IDT) : DSTU IDF 149A:2003* — [Chynnyj vid 2003—08—01]. — K. : Derzhspozhyvstandart Ukrainy 2003. — 18 s.
8. *Krus' G. N. Metody issledovanija moloka i molochnyh produktov / G. N. Krus', V. M. Shalygina, Z. V. Volokitina.* — M. : Kolos. — 2000. — 367 s.