МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_______ М. М. Барановський
«__»_________2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»
СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

Тема: «Технологія отримання пробіотичного препарату Лацидофілу»

Виконавець: студентка 402 ФЕБІТ Антонова В.В.

Керівник: к. т. н., доцент кафедри біотехнології Решетняк Л. Р.

Нормоконтролер: Дражнікова А. В.

КИЇВ 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ М. Барановський

«___» ____ _____2021р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Антонової Валерії Веніамінівни

1. Тема дипломної роботи: «Технологія отримання пробіотичного препарату Лацидофілу» затверджена наказом ректора від «11» травня 2021 р.

№ 715/ст.

2. Термін виконання роботи: з 10 травня по 20 червня 2021 р.

3. Вихідні дані роботи: поживні середовища для культивування, молочнокислі бактерії, біологічні агенти – бактерії роду *Lactobacillus,* основне обладнання для отримання пробіотичного препарату Лацидофілу.

4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИКІВ; РОЗДІЛ 2. ОБ’ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

5. Перелік обов’язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 17 таблиць, 17 рисунків.

6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Узгодження змісту дипломної роботи з керівником	10.05.21	
2	Підбір літератури та наукових матеріалів за темою дипломної роботи	11.05.21 – 15.05.21	
3	Написання основної частини дипломної роботи	16.05.21 – 30.05.21	
4	Оформлення дипломної роботи	31.05.21	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	1.06.21 – 3.06.21	
6	Виправлення недоліків	4.06.21 – 7.06.21	
7	Захист дипломної роботи	15.06.21	

7. Дата видачі завдання: «10» _травня__ 2021 р.

Керівник дипломної роботи _____ Решетняк Л. Р.

Завдання прийняла до виконання _____ Антонова В. В.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Технологія отримання пробіотичного препарату Лацидофілу»: 75 сторінок, 17 рисунків, 17 таблиць, 66 літературних джерела.

Об’єкт дослідження: культивування пробіотичних бактерій.

Предмет дослідження: пробіотик Лацидофіл.

Мета роботи: вдосконалити технологію отримання пробіотичного препарату Лацидофілу.

Методи дослідження: аналітичні, біохімічні, мікробіологічні.

Результати бакалаврської роботи рекомендується використовувати під час

проведення наукових досліджень та в практичній діяльності фахівців-біотехнологів.

Лацидофіл є пробіотиком 3-го покоління, біологічними агентами якого є мікроорганізми *Lactobacillus helveticus* та *Lactobacillus rhamnosus*. Підібрано збалансоване поживне середовище для культивування мікроорганізмів *L. rhamnosus* та *L. helveticus* на основі середовища MRS із додаванням соєвого борошна замість бактеріологічного пептона у якості джерела азотного живлення. Показано, що оптимальним pH для вирощування лактобактерій є 7,0; оптимальною дозою посівного матеріалу є 5% від об’єму поживного середовища. Удосконалено технологічну схему отримання Лацидофілу, що дозволяє знизити вартість виробництва на 10%.

ПРОБІОТИЧНИЙ ПРЕПАРАТ, ПРЕБІОТИКИ, МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, БІОМАСА, КУЛЬТИВУВАННЯ, ЛАЦИДОФІЛ.

ЗМІСТ

ВСТУП 7
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИКІВ 8
1.1. Сучасні підходи підтримання і відновлення мікробіоти людини 8
1.2. Історія терміну «пробіотики» 11
1.3. Класифікація пробіотиків 13
1.4. Характеристика пробіотичного препарату Лацидофілу 18
1.5. Терапевтичні функції пробіотиків 21
1.6. Висновки до розділу 24
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 25
2.1. Об'єкти дослідження 25
2.1.1. Характеристика поживних середовищ 25
2.1.2. Властивості біологічних агентів – *Lactobacillus rhamnosus* та *Lactobacillus helveticus* 30
2.1.3. Основні типи обладнання 34
2.2. Методи дослідження 35
2.2.1. Визначення біомаси 35
2.2.2. Визначення протеолітичної активності 39
2.2.3. Потенціометричний метод визначення кислотності 41
2.2.4. Метод визначення граничної кислотності 42
2.2.5. Визначення сирого протеїну методом Кьельдаля 43
2.3. Висновки до розділу 44
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 45
3.1. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* та *L. helveticus* 45
3.2. Підбір поживного середовища для вирощування культури *L. rhamnosus* 49
3.3. Аналіз отриманих результатів дослідження 54

3.3.1. Результати культивування молочнокислої бактерії *L. rhamnosus* на стандартному та збалансованому середовищах MRS 54
3.3.2. Залежність виходу біомаси від pH 55
3.4. Вибір типу біореактора для культивування молочнокислих бактерій ... 56
3.5. Сублімаційна сушарка KEMOLO FD300 60
3.6. Технологія виробництва Лацидофілу 64
3.7. Висновки до розділу 67
ВИСНОВКИ 68
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 69

ВСТУП

Актуальність теми. Мікробіота кишковика беззаперечно є важливим аспектом формування імунітету, процесів обміну речовин, здоров'я та стабільності організму людини. Функціонування складу кишковика залежать від навколишнього середовища, кліматичної зони, продуктів у постійному раціоні харчування, параметрів людини, віку індивідуума, а також від образу життя та наявності або відсутності поганих звичок. Сучасними засобами лікування мікробіоти є: пребіотики, пробіотики, синбіотики, нутрицевтики, продукти функціонального харчування з метаболітами мікроорганізмів та з живими бактеріями; препарати з інактивованими пробіотичними мікроорганізмами та з активними метаболітами пробіотиків.

Метою роботи є вдосконалити технологію отримання пробіотичного препарату Лацидофілу.

Завдання роботи:

1. Провести моніторинг властивостей мікроорганізмів, що використовуються для виробництва пробіотику Лацидофіл;
2. Підібрати збалансоване поживне середовище для біосинтезу молочнокислих бактерій;
3. Визначити оптимальні параметри культивування мікроорганізмів *L. rhamnosus* та *L. helveticus;*
4. Удосконалити технологічну схему для біосинтезу молочнокислих бактерій.

Об'єкт дослідження – культивування пробіотичних бактерій.

Предмет дослідження – пробіотик «Лацидофіл».

Методи дослідження – аналітичні, біохімічні, мікробіологічні.

РОЗДІЛ 1
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИКІВ

1.1. Сучасні підходи підтримання і відновлення мікробіоти людини

Мікробіота кишковика беззаперечно є важливим аспектом формування імунітету, процесів обміну речовин, здоров'я та стабільності організму людини та тварини. Вона також має вплив на такі функції як травлення, синтез вітамінів, виведення ряду токсинів та алергенів та багато інших. Склад та якість мікробіоти відповідає не тільки за фізичний стан організму, але і підтримує психоемоційну сферу, з чого випливає якість життя людини. Безмежна кількість досліджень підтверджує важливість дії мікроорганізмів в кишковика живих істот [1].

Формування та функціонування складу кишковика залежать від низки причин, таких як стан навколишнього середовища, кліматичної зони, продуктів у постійному раціоні харчування, параметрів людини або тварини, віку індивідуума, а тож від образу життя та наявності або відсутності поганих звичок. Приклади впливу різних продуктів харчування на вміст бактерій можна побачити в таблиці 1.1 [2]. Взаємозв'язок між стабільністю різноманіття мікроорганізмів та наявності хвороб є гарним показником того, що при впливі оточуючого середовища схожі бактерії можуть заміняти функції вже зниклих штамів. Однак біорізноманіття є очевидним параметром здорового кишковика. Власні анаеробні грампозитивні мікроорганізми складають стабільність мікробіоти організму та формують резистентність до потрапляння та розвитку чужорідних бактерій у ньому [3].

Такі хвороби, як ожиріння, діабет 2 типу, запальні захворювання кишковика, атопічна екзема та ін. мають тенденцію до зменшення різноманіття мікроорганізмів в кишковику. Сюди же відноситься хвороба Крона у курців [4, 5].

Таблиця 1.1

Приклади харчових продуктів, поживних речовин та режимів харчування, що впливають на здоров’я людини [2]

Найменування харчових продуктів	Вплив на мікробіом кишковика	Вплив на здоров'я, опосередкований мікробіомом кишковика	Спостережні дослідження на людях	Інтервенційні дослідження на людях
Дієта з низьким вмістом ферментованих олігосахаридів, дисахаридів, моносахаридів та поліолів	Підвищення актинобактерій; дієта з високим вмістом цих речовин зменшила кількість бактерій, що беруть участь у споживанні газу	Зменшені симптоми синдрому подразненого кишковика	Так	Так
Сир	Збільшення кількості біфідобактерій, які відомі своєю позитивною користю для господаря через їх метаболічну діяльність. Зниження рівня бактеріоїдів та клостридій, деякі штами яких пов’язані з кишковими інфекціями	Потенційний захист від патогенних мікроорганізмів. Збільшення виробництва жирних кислот з невеликим ланцюгом та зменшення виробництва N-оксиду триметиламіну	Так	Так
Клітковина та пребіотики	Збільшення різноманітності мікробіоти та виробництва жирних кислот з невеликим ланцюгом	Зниження впливу діабету 2 типу та серцево-судинних захворювань	Так	Так

Закінчення таблиці 1.1

Штучні підсолоджувачі	Заростання протеобактерій та кишкової палички. Бактероїди, клостридії та загальні аеробні бактерії були значно нижчими, а pH фекалій був значно вищим	Індукована непереносимість глюкози	Ні	Ні
Поліфеноли (наприклад, з чаю, кави, ягід та овочів, таких як артишок, оливки та спаржа)	Підвищений захист кишкового бар'єру (біфідобактерії та лактобактерії), бактерій, що продукують бутират (*Faecalibacterium prausnitzii* та *Roseburia*), *Bacteroides vulgatus* та *Akkermansia muciniphila.* Зниження продуцентів ліпополісахаридів (*E coli* та *Enterobacter cloacae*).	Мікроорганізми кишковика змінюють біодоступність поліфенолу, що призводить до зменшення маркерів метаболічного синдрому та маркерів серцево-судинного ризику	Так	Так
Веганська дієта	Скромні відмінності у складі у людей та сильні відмінності в метаболічному профілі порівняно з раціоном всеїдних людей	Деякі дослідження показують перевагу вегетаріанської перед всеїдною дієтою, інші не можуть знайти різниці	Так	Так

Сучасними напрямами лікування та підтримки сталості мікробіоти є велика кількість препаратів, а також компонентів харчування, які застосовуються для корегування та позитивного впливу на мікробіологічний склад кишковика. До них відносяться такі великі групи як: пребіотики, які складаються з речовин немікробного походження та впливають на розвиток облігатної мікробіоти; пробіотики, які представляють мікроорганізми, що корегують стан мікробіоти кишковика; синбіотики, як об'єднання пребіотичних та пробіотичних препаратів; нутрицевтики, що являють собою різні складові харчування та біологічно активні добавки для відновлення мікробіоти; продукти функціонального харчування з метаболітами мікроорганізмів та безпосередньо з живими бактеріями; препарати з інактивованими пробіотичними мікроорганізмами та з активними метаболітами пробіотиків [6].

Загальноприйнятим та найбільш поширеним є використання саме пробіотиків для лікування та відновлення стану організму. Вони можуть надавати позитивний ефект прямої дії на господаря, шляхом продукування імуномодулюючих та біологічно активних речовин.

1.2. Історія терміну «пробіотики»

Ілля Мечников, який являється лауреатом Нобелівської премії та видатним російським вченим, передбачав, що молочнокислі бактерії позитивно впливають на організми і можуть продовжувати життя. Вченим було відмічено, що шляхом заміни протеолітичних бактерій на корисні лактобактерії можна зупинити «самоотруєння кишковика», яке призводить до старіння організму. За його словами протеолітичні культури такі, як *Clostridium*, продукують шкідливі речовини, що містять індол, фенол і амоній внаслідок розкладання білків, який є токсичним для організм [7].

Досліджуючи питання старіння і зібравши дані по 36 країнам, І.І. Мечников встановив, що найбільша кількість довгожителів в Болгарії - 4 на 1000 чоловік. Він пов'язав це з болгарським йогуртом (в Болгарії його називають кисело мляко - «кисле молоко»). У своїх працях І.І. Мечников став пропагувати широкої громадськості корисність болгарського йогурту [8].

Ним була розроблена дієта, що включала кисломолочні продукти. Вони були синтезовані шляхом ферментації молока бактеріями, які він назвав *Bacillus bulgaricus*. Розробка І. І. Мечникова передбачала ентеральне введення культури молочнокислих бактерій проти гнильних мікроорганізмів, щоб цілеспрямовано змінити склад шлунково-кишкової мікробіоти, винайшовши таким чином новий тип бактеріальних препаратів – пробіотиків [7].

У 1917 році німецький професор Альфред Ніссль виділив непатогенний штам *E. coli* із фекалій солдатів Першої світової війни, що перебували в епідемії важкої бацилярної дизентерії на тлі спалаху хвороби, та за незрозумілими причинами не хворіли на ентероколіт. Саме тому такий штам, як *Escherichia coli Nissle* 1917, вважається прикладом пробіотика, який не відносять до кисломолочних бактерій [9].

Вперше такий мікроорганізм, як *Bifidobacterium,* був отриман з калу немовляти вченим Анрі Тіссьєром. Він був названий *Bacillus bifidus communis*. Анрі звернув увагу на те, що такі бактерії здатні замінювати протеолітичні мікроорганізми, які призводять до виникнення діареї. Він припустив, що у разі виникнення діареї для немовлят повинні бути застосовані біфідобактерії.

Термін «пробіотики» вперше був запропонований в 1965 році вченими Ліллі і Стілвелл; на противагу антибіотикам пробіотиками називали фактори мікробного походження, які стимулюють зростання інших організмів [9].

У 1974 році Паркер дав таке визначення мікробним препаратам як пробіотики, що здатні до налагодження кишкової флори [6].

У 1995 році Гленн Гібсон та Марсель Роберфроїд представили концепцію пребіотиків. Вони визначили пребіотик як «неперетравлюваний харчовий інгредієнт, який благотворно впливає на господаря, селективно стимулюючи ріст та / або активність однієї або обмеженої кількості бактерій у товстій кишці, і таким чином покращує здоров’я господаря». Незважаючи на те, що це оригінальне визначення неодноразово переглядалось, основні особливості здебільшого зберігалися [10].

У 1997 році Воробйов вивчав питання дисбалансу мікробіоти. Вчений зазначив біологічні продукти, що були отримані із нормальної флори та застосовані в якості ліків для цієї хвороби, як еубіотики. До таких сполук було прийнято включати

продукцію, що містять *E. coli, Lactobacillus* і *Bifidobacterium* та деякі бактерії у спорових формах [11]. Водночас з цим Шендеров відмічає, що під термін еубіотики відповідають тільки певним видам пробіотиків. Відповідно, Шендеров посилався на те, що пробіотики являються препаратами, які містять мікробні та немікробні вихідні речовини [12]. Вони здатні позитивно впливати на біохімію організму шляхом покращення стану та дії мікроорганізмів при природному введенні. Такий факт вказує на те, що можна розглядати в якості пробіотиків бактерії, живі або деактивовані, а також будь-які складові відповідного мікроорганізму, які здатні покращувати життєдіяльність кишкової мікробіоти організму та можуть допомагати краще підлаштовуватися до оточення в певній сфері.

Згодом були синтезовані різноманітні види препаратів, такі як Біфідумбактерин, Колібактерин, Лактобактерин та ін., на основі живих біфідо- та лактобактерій. Ці препарати відомі для багатьох людей і навіть в наш час часто застосовуються з метою покращення роботи кишкової флори та як метод лікування шлунково-кишкових захворювань.

У 2001 було остаточно встановлено значення терміну «пробіотики» Продовольчою та сільськогосподарською організацією ООН та Всесвітньою організацією охорони здоров’я [13].

В наш час значно посилились дослідження різноманітних характеристик та властивостей пробіотиків. Внаслідок цього прискорився процес відбору найбільш активних штамів мікроорганізмів. Що стосується порівняння, на даний момент покращуються методи визначення антагоністичних властивостей мікроорганізмів та відповідних штамів, а також є важливим вивчення їх ферментативних та біохімічних властивостей.

1.3. Класифікація пробіотиків

Класифікуючи пробіотики, необхідно ураховувати те, що ці речовини є лікарськими засобами з гетерогенною складовою. Важливими є штами бактерій, що містяться в продукції, їх кількість та вид мікроорганізмів. З таблиці 1.2 можна зробити

висновок, що основними бактеріями, які використовуються для створення пробіотичних лікарських засобів, є молочнокислі мікроорганізми роду *Lactobacillus*, рід *Bifidobacterium, Saccharomyces*, а також *Escherichia coli, Enterococcus, Streptococcus* та ін. [14, 15].

Таблиця 1.2

Основні мікроорганізми-пробіотики [14, 15]

Мікроорганізми роду *Bifidobacterium*	Мікроорганізми роду *Lactobacillus*	Мікроорганізми інших родів
B. infantis	*L. acidophilus*	*Saccharomyces cerevisiae*
B. longum	*L. casei*	*Saccharomyces boulardii*
B. breve	*L. lactis*	*Streptococcus thermophilus*
B. adolescentis	*L. delbrueckii*, підтип *bulgaricus*	*Escherichia coli Nissle*
B. lactis	*L. fermentum*	*Enterococcus faecium*

Окрім списку загальновживаних мікроорганізмів існує поділ на декілька основних груп-поколінь, які ураховують особливості складу пробіотичних препаратів. До них відносяться:

1. Монокомпонентні препарати (перше покоління). Препарати такого типу містять лише один штам мікроорганізмів. Прийнято використовувати пробіотики першого покоління для локального лікування мікробіоти кишковика. Дія насамперед направлена на певний штам мікроорганізмів, тому для досягнення результату рекомендовано попередньо проходити консультацію з лікарем для уточнення природи захворювання. Лікування пробіотиком першого покоління найчастіше вживаються при дисбактеріозних розладах кишковика першої ступені. Прикладами цих препаратів є: Лактобактерин, Колібактерин та ін [16].

Найбільш поширеним виглядом пробіотиків І покоління є сухий ліофілізований порошок. У такому стані препарат розводять у теплій воді. Вживається у залежності від ваги та віку пацієнта.

Монокомпонентні пробіотики насамперед відзначаються низкою недоліків. Зазначено, що процес ліофілізації, якому піддають пробіотичні препарати, надають знижену життєздатність бактеріям, і внаслідок це призводить до недостатньої терапевтичної ефективності. Бактеріям необхідно близько 8-10 годин для переходу в активний стан із стану анабіозу, у якому вони знаходяться через попередній процес висушування. Також зазначено, що мікроорганізми не здатні надійно прикріплюватися до стінок кишковика через втрату певних специфічних рецепторів внаслідок стадії ліофілізації.

Також існує великий ризик розчинення бактеріальних оболонок та ураження мікроорганізмів під впливом насамперед кислого середовища шлунка, а далі – панкреатичних ферментів, жовчних кислот і т.д. у разі відсутності інкапсулювання бактерій, які потрапляють до організму людини. Через зниження сорбційної властивості бактерій також знижується здатність фіксації на ворсинках кишковика. Ще одним недоліком може бути несумісність мікробіоценозу людини та бактерій препарату. За результатами аналізів та дослідів, відомо, що тільки близько 1-3% бактерій, які знаходяться у ліофілізованому вигляді, дійсно потрапляють до кишковика та можуть нести певний позитивний вплив на мікробіоту відповідно до їх властивостей.

Через низький рівень вмісту бактерій в препаратах першого покоління більшість препаратів мають періодичний характер лікувальної активності. У разі припинення терапії, штами, отриманні при вживанні пробіотика, дуже швидко покидають мікробіоту кишковика та заміщуються довільними мікроорганізмами.

Ліофілізовані пробіотики можуть спричиняти алергічні реакції в організмі у разі вживання високих доз препарату. До того ж вони можуть викликати діаретичні розлади кишковика у людей з субкомпенсованою лактазною недостатністю. Також можуть виникнути аутоімунні реакції внаслідок використання сухих пробіотиків з кишковою паличкою у їх складі.

2. Антагоністи (друге покоління). Препарати такого типу представлені дією конкурентного типу. Склад таких пробіотиків містить у собі штами, які не відносяться до представників нормальної мікробіоти кишковика. Прикладами цих препаратів є

Ентерол, Спорбактерин. Для пробіотиків другого типу використовують дріжджі такої родини як *Saccharomyces (*наприклад, *S. boulardii)* або бактерії родини *Bacillus (*наприклад, *B. cereus, B. subtilis, B. Clausii)* [16].

Механізмом дії являється потрапляння таких мікроорганізмів до внутрішньої мікробіоти людини та витіснення патогенних або умовно патогенних бактерій. При цьому як наслідок на місце цих негативно діючих на організм штамів не встають мікроорганізми препарату. Такі пробіотики призначають при гострих неінфекційних діареях або легких та середніх за тяжкістю формах кишкових інфекцій. Лікування може досягати 5-7 днів. Зазвичай курс закінчується прийомом пробіотиків, які мають штами, що відносяться до нормальної мікробіоти кишковика людини. Це необхідно через те, що мікроорганізми препарату другого покоління є чужорідними і можуть бути антагоністами не тільки для патогенних штамів всередині організму, але і до безпосередньо нормальної мікробіоти [17].

3. Симбіотики полікомпонентні (третє покоління). Препарати такого типу представлені штамами декількох мікроорганізмів, які позитивно впливають на дію одне одного та посилюють ефект на мікробіоту. До таких пробіотиків належать препарати: Біфіформ, Лінекс, Вагілак, Біовестин-лакто та ін.

Полікомпонентні пробіотики можуть містити штами мікроорганізмів як одного виду, так і різних. На відміну від пробіотиків першого покоління вони є більш збалансованими за складом. Додаткові речовини в таких препаратах також впливають на покращення активності та життєдіяльності цих симбіотичних штамів [18].

4. Синбіотики або іммобілізовані на сорбенті живі бактерії (четверте покоління). Препарати цього типу є комбінованими та зазвичай містять у складі речовини (наприклад, вітаміни, полівалентні імуноглобуліни та ін.), які викликають імуномодулюючу дію. Прикладом таких препаратів є Флорин, Біфідумбактерин форте [6].

Сорбовані мікроорганізми мають низку переваг перед несорбованими. Як наслідок, вони мають більш активну дію ніж аналоги, гарно утримуються на оболонці кишковика та надають більш універсальний захист від патогенних та умовно-патогенних штамів [19, 20]. Дія бактерій починається після потрапляння до

кишковика та десорбції. Причиною особливості механізму впливу є структура таких пробіотиків. На відміну від ліофілізованих препаратів, пробіотики четвертого покоління можуть ефективніше взаємодіяти з кишковиком та мають більшу антагоністичну активність.

Для покращення дії пробіотиків прийнято використовувати ентеросолюбільні капсули. Це покриття забезпечує захист бактерій від дії соляної кислоти при потраплянні до шлунку та загалом захищає від оточуючого середовища. Полісахаридний шар попереджує взаємодію мікроорганізмів з довкіллям під час виробництва та на період зберігання. Такі капсули насамперед є чутливими до pH, і при потраплянні у нейтральне середовище пробіотики вивільняються. Тим самим можна відмітити, що мікроорганізми доставляються без пошкодження та втрат саме до тонкого кишковика, де і розчиняється ентеросолюбільне покриття [21].

5. Синбіотики з наявністю про- та пребіотичних комплексних складових (п’яте покоління). Препарати цього типу є більш складними та досконалими за складом полікомпонентними пробіотиками. Зазвичай вони містять декілька видів мікроорганізмів облігатної мікробіоту та додаткові речовини, які підвищують швидкість їх росту. Прикладом такого пробіотику є Біфітен [22].

В таблиці 1.3 представлені пробіотичні препарати, які прийнято поділяти за формою випуску:

Таблиця 1.3

Класифікація пробіотиків за формою випуску препарату

Форма випуску	Приклад препарату
Рідка	Лактофлор, Флористин, Біовестин-лакто
Сорбційна	Біфідобактерин, Біфікол форте
Порошкова або суха форма	Лактобактерин, Біфідумбактерин
Кишковорозчинні капсули	Лінекс, Ацилол

1.4. Характеристика пробіотичного препарату Лацидофілу

Лацидофіл – пробіотик 3-го покоління. До складу препарату входять пробіотичні агенти *Lactobacillus rhamnosus* та *Lactobacillus helveticus*. Допоміжними речовинами є мальтодекстрин, стеарат магнію, аскорбінова кислота та желатин.

Випускається препарат у формі капсул, на 1 капсулу припадає не менше ніж $2x10^9$ КУО ліофілізованих бактерій *L. rhamnosus* у кількості 95% від загальної маси мікроорганізмів та *L. helveticus* – 5% (табл. 1.4). Міститься у вигляді дрібного порошку кольору слонової кістки з невеликими бежевими вкрапленнями [23].

Таблиця 1.4

Вміст бактерій роду *Lactobacillus* у препараті Лацидофіл

Культура	Вміст
Lactobacillus rhamnosus	$1,9x10^9$ КУО
Lactobacillus helveticus	$0,1x10^9$ КУО

Препарат Лацидофіл відноситься до фармакологічної групи сполук антидіарейної дії. Культура *Lactobacillus rhamnosus*, як основний біологічний агент препарату, володіє високою кислотообразуючою активністю, антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (рис. 1.1, рис. 1.2.) [24].

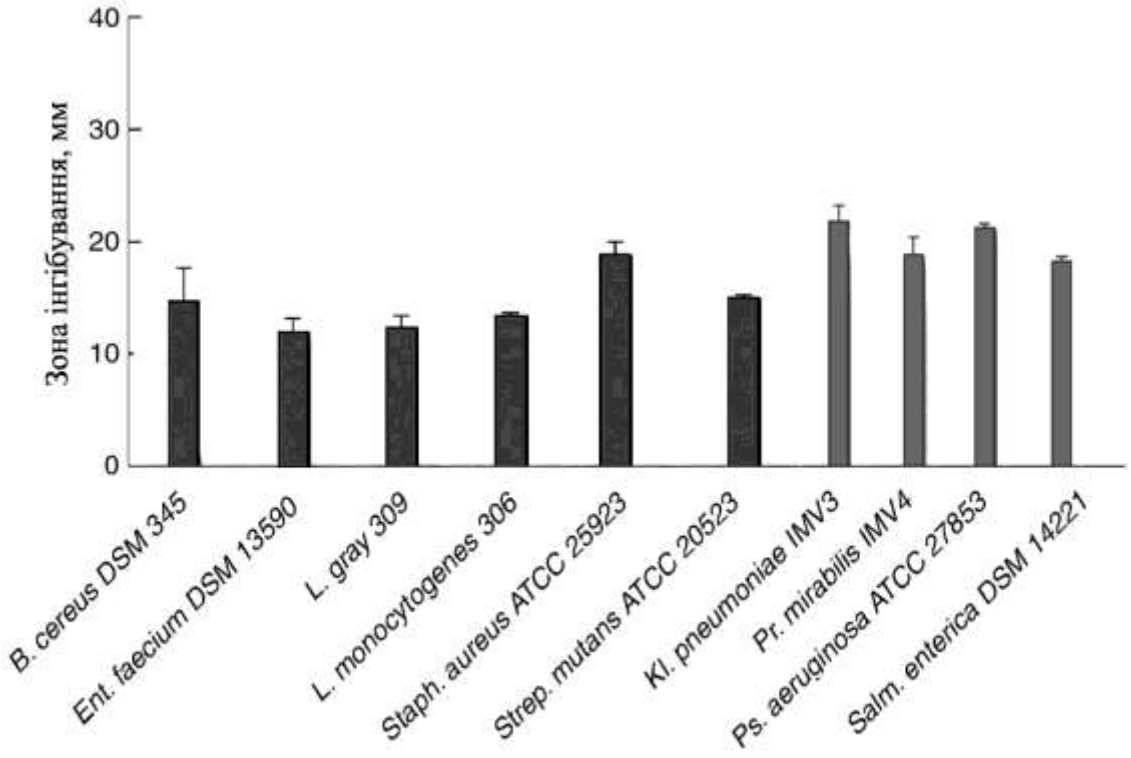

Рис. 1.1. Антимікробна активність культури *Lactobacillus rhamnosus* щодо грампозитивних (■) і грамнегативних бактерій (■) [24]

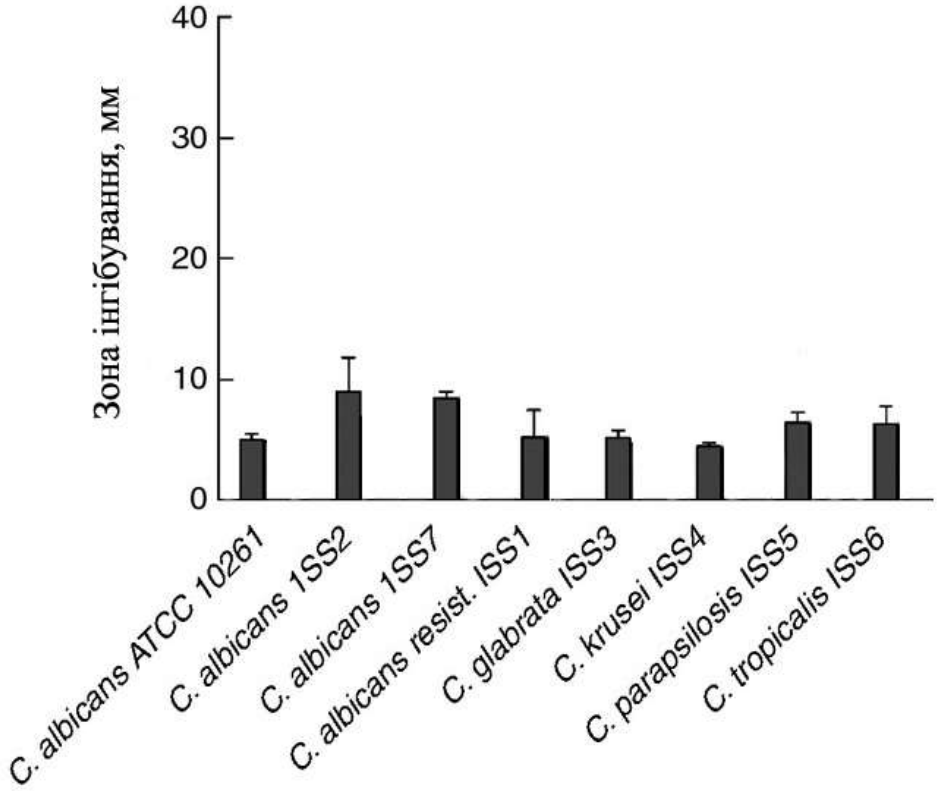

Рис. 1.2. Антимікробна активність культури *Lactobacillus rhamnosus* щодо штамів дріжджів роду *Candida* [24]

Рекомендується для профілактики та лікування діареї, в тому числі викликаної паличкою *Clostridium difficile* та для комплексного лікування захворювань шлунка і дванадцятипалої кишки, асоційованих з *Helicobacter pylori*, разом з антибактеріальною терапією. Препарат сприяє відновленню і нормалізації мікробіоти кишковика, поліпшення травлення. Застосовується для лікування гастроентериту, диспепсії, транзиторних дисфункцій кишковика (як діареї, так і закрепу), пов'язаних зі зміною харчового раціону, подорожами та іншими причинами. Являється допоміжним лікуванням атопічного дерматиту [23].

Молочнокислі бактерії присутні в травному тракті людини, бо вони є частиною природного екологічного бар'єру. Вони підтримують баланс кишкової мікробіоти, запобігають збільшенню кількості патогенних гнильних бактерій в кишечнику, запобігають утворенню і впливу деяких ендотоксинів.

Дія лікарського засобу Лацидофілу полягає в тому, що молочнокислі бактерії продукують перекис водню, активують макрофаги і сприяють продукуванню субкласу імуноглобуліну G (IgG2), тим самим стимулюють активність імунних процесів. Вони сприяють синтезу деяких вітамінів групи В (В1, В2, В6, В12, ніацину, фолієвої кислоти, пантотенової кислоти). Позитивно впливають на перистальтику кишечника, покращують перетравлення білків і сприяють розщепленню лактози на глюкозу і галактозу, а також сприяють продукуванню молочної кислоти. Пригнічують діяльність нітроредуктази, азоредуктази і бета-глюкуронідази, тим самим зменшують вироблення канцерогенних амінів [23].

Протипоказаннями до використання є гіперчутливість до діючих речовин або до одного з допоміжних речовин препарату Лацидофіл.

При виробництві в активних речовинах можуть залишитися сліди молока, сої та сахарози. Пацієнтам з алергією на молоко або сою не слід приймати препарат Лацидофіл. При непереносимості деяких видів цукру необхідно проконсультуватися з лікарем.

1.5. Терапевтичні функції пробіотиків

Багатофакторні механізми, які ховаються в позитивній дії антибіотиків на організм людині, досить залишаються не вивченими у повній мірі, однак ефекти, які можуть бути отримані при використанні тих чи інших пробіотиків, та їх вплив на здоров'я є відомими. Існують певні захворювання, під час яких пробіотики можуть продукувати антимікробні з'єднання, підвищувати якість захисних сил кишковика, активувати роботу імунної системи та створювати антагоністичну конкуренцію за субстрати росту та різні допоміжні поживні речовини в організмі, що і формує деякі статичні механізми дії. Ці речовини відомі за своєю властивістю до профілактики певних хвороб, які пов'язані із розладами кишковика, наприклад діареї. Відомо, що вони здатні прискорювати формування необхідних організму речовин та покращувати їх дію і використання [19].

Важливою функцією роботи мікроорганізмів в пробіотиках є продукування сполук, які несуть у собі антибактерицидну здатність через наявність активної білкової частини у її складі. Такі речовини називаються бактеріоцинами [25]. Разом з ними можуть продукуватися різні органічні кислоти, такі як молочна або оцтова. Цей процес призводить до зміни мікробної мікробіоти всередині організму.

Доведено, що пробіотики здатні прикріплюватися до слизової оболонки кишковика та забезпечують антагоністичну дію направлену на патогенні мікроорганізми, внаслідок чого призводять до адгезії та прибирання слизу з епітелію. Такий механізм сприяє підвищенню захисту та цілісності кишкового бар'єру.

Іншим шляхом впливу на патогенні бактерії є пригнічення їх життєдіяльності через конкурування за поживні речовини, використання яких притаманне як бактеріям пробіотиків, так і патогенній та умовно-патогенній мікробіоті.

Важливою є захисна робота епітеліального шару кишковика. При недостатньому захисті з цього боку, патогенні мікроорганізми можуть вражати як поверхневі ділянки організму, так і ділянки підслизової оболонки. Внаслідок є великий ризик утворення запальних процесів та різних захворювань. Пробіотики

стимулюють конкурентне виключення та протистоять прикріпленню патогенних бактерій до поверхневого шару епітелію кишковика.

З іншого боку не менш важливою є швидкість та якість імунної відповіді організму на зовнішнє втручання патогенів. Цей процес є складним та багатоступеневим, направленим на розпізнавання антигенів з метою елімінації. Пробіотичні мікроорганізми здатні прискорювати вроджені та адаптивні функції в організмі.

Додатково необхідно позначити властивість пробіотиків до протипухлинної дії (табл. 1.5) [26]. Доведений позитивний ефект під час лікування та зменшення прогресу різних видів ракових захворювань. До досліджених онкохвороб та вплив мікроорганізмів на них можна віднести пухлинні захворювання товстого кишковика, сечового міхура, молочних залоз, шийки матки та ін. Також пробіотики застосовують для покращення загального стану організму під час лікування хіміотерапією.

Таблиця 1.5

Протипухлинна дія пробіотиків на онкологічних хворих [26]

Пробіотичний штам	Об’єкти	Доза та тривалість дослідження	Ефекти
Lactobacillus plantarum CG MCC, *Lactobacillus acidophilus*-11 та *Bifidobacterium longum*-88	1. Хворі на рак прямої кишки 2. 150 пацієнтів (1:1 співвідношення групи пробіотиків та плацебо)	*1. Lactobacillus plantarum* CGMCC no.1258; 10^{11} (КУО/г) 2. *Lactobacillus acidophilus;* 10^{11} (КУО/г), 3. *Bifidobacterium longum*-88; 10^{10} (КУО/г) 4. Пацієнтам вводили пробіотик 6 днів до операції та 10 днів після операції	Пробіотики знижували концентрацію зонуліну в сироватці крові, тривалість післяопераційної піреxії, тривалість антибіотикотерапії та частоту післяопераційних інфекційних ускладнень, а також інгібували сигнальний шлях p38 мітоген-активованої протеїнкінази

Закінчення таблиці 1.5

Lactobacillus rhamnosus LC 705 та *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii strains*	1. Афлатоксин-індукований рак печінки 2. 90 студентів чоловічої статі з високим рівнем афлатоксину в сечі	5 тижнів, (1:1, мас.:мас.) У дозі 2–5 × 10^{10} КУО/добу	61,5% зниження біомаркера раку печінки, що призводить до зменшення виведення з сечею афлатоксину B1-N7 гуаніну
Lactobacillus casei Shirota (LcS)	1. Рак молочної залози 2. 968 хворих на рак молочної залози (306 пробіотичних груп; 662 контрольних) у віці від 40 до 55 років	Часте споживання Якульта (Yakult), що містить *Lactobacillus casei Shirota* та ізофлавони з соєвого продукту протягом 2 років	Регулярне споживання *Lactobacillus casei Shirota* та ізофлавонів з підліткового віку було обернено пов'язане з частотою раку молочної залози у японських жінок
Lactobacillus acidophilus L1	1. Рак сечового міхура 2. Загалом 180 випадків (середній вік: 67 років) та 445 контрольних груп на основі популяції	200 г йогурту, що містить *L. acidophilus* L1, протягом 10 тижнів	Звичайне надходження молочнокислих бактерій знижує ризик раку сечового міхура
Lactobacillus casei Shirota (LcS)	1. Рак шийки матки 2. 54 жінки з ВПЛ-позитивним внутрішньоепітеліальним ураженням	Щоденне введення препарату Якульт (Yakult), що містить *Lactobacillus casei Shirota*, протягом 6 місяців	Зниження на 60% зараженої вірусом папіломи людини (ВПЛ) інфекції та попередників раку шийки матки

До поширених захворювань, на які здатні діяти пробітики належать алергії різних типів, ураження дихальних шляхів інфекіями та СНІД. Також певні досліди посилаються на позитивний вплив препаратів при діабеті 2 типу, ожирінні, аутизмі та остеопорозі [26].

1.6. Висновки до розділу

Лацидофіл відноситься до пробіотиків 3 покоління – полікомпонентних симбіотиків та відноситься до фармакологічної групи сполук антидіарейної дії. Випускається препарат у формі капсул, на 1 капсулу припадає не менше ніж $2x10^9$ КУО ліофілізованих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* у кількості 95% від загальної маси мікроорганізмів та *Lactobacillus helveticus* – 5%. Пробіотики здатні підвищувати якість захисних сил кишковика, створювати антагоністичну конкуренцію за субстрати росту, а також продукувати сполуки, які несуть у собі антибактерицидну здатність.

Пробіотики також володіють протипухлинною дією, здатні впливати на алергії різних типів, ураження дихальних шляхів інфекіями та СНІД; надають позитивний вплив при діабеті 2 типу, ожирінні, аутизмі та остеопорозі.

РОЗДІЛ 2
ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

2.1.1. Характеристика поживних середовищ

Для росту і життєдіяльності лактобактерій використовуються такі середовища:

1. Середовище МРС (Табл. 2.1) [27]. Для культивування молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* використовують такі середовища, які є класичними для культивування лактобактерій [28]: МРС - рідке і МРС-1 - напіврідке з 0,15% агару. До складу середовища МРС з pH 6,2-6,6 входять такі компоненти:

Таблиця 2.1

Склад середовища МРС [27]

Компонент	Склад (г/л)
Декстроза	20,0
Бактеріологічний пептон	10,0
М'ясний екстракт	8,0
Ацетат натрію	5,0
Дріжджовий екстракт	4,0
K2HPO4	2,0
Цитрат амонію	2,0
Твін-80	1,0
Сульфат магнію	0,2
Сульфат марганцю	0,05
Бактеріологічний агар	10,0

Тверде агаризоване середовище MPC відповідає вимогам росту окремих молочнокислих бактерій, наприклад, як *L. brevis* або *L. fermenti* та інших. У складі MPC є цитрат амонію, який відповідає за процес пригнічення різних мікроорганізмів при кислому pH, що не відносяться до лактобактерій. Екстракти і пептон у складі є основою для надання необхідних речовин для лактобацил. З цих компонентів мікроорганізми отримують значну кількість амінокислот, азотних сполук, а також вітаміни і солі. Твін-80 у складі MPC є емульгатором; гідроортофосфат та ацетат калію є буферними компонентами, які впливають на зниження рівня pH; сульфати магнію та марганцю підвищують рівень іонів та сульфатів, а декстроза являє собою важливе джерело вуглецю для отримання енергії.

Середовище MPC задовольняє всім ростовим потребам, які притаманні пробіотичним бактеріям, однак недоліком є велика кількість компонентів у його складі.

2. Поживне середовище на основі капустяного відвару, молочної сироватки та дріжджового автолізату (табл. 2.2) [29]. Таке середовище не підходить для використання у виробничих масштабах, тому що не дає змогу отримати велику кількість біомаси. Середовище на основі капустяного відвару насамперед використовується для виділення лактобактерій.

Таблиця 2.2

Склад середовища для вирощування лактобактерій на капустяному відварі

Компонент	Склад (г/л)
Молочна сироватка	9-10,0
Дріжджовий автолізат	9-10,0
Глюкоза	1,9-2,0
Оцтова кислота 70%	0,14-0,16
Агар	1,8-2,0
Капустяний відвар	Інше

3. Середовище Лактобакагар (табл. 2.3, табл. 2.4.) [30, 31] – для виділення і культивування лактобацил. Лактобакагар має вигляд дрібнодисперсного порошку жовтого кольору, що виявляє світлочутливість і гігроскопічність.

Таблиця 2.3

Склад середовища Лактобакагар [31]

Компонент	Склад (г/л)
Панкреатичний гідролізат рибного борошна	20,0
Екстракт пекарських дріжджів	5,0
Екстракт м'ясної або пептон сухий ферментативний	5,0
Д-глюкоза	20,0
Калій фосфорнокислий однозаміщений	2,0
Натрій оцтовокислий 3-водний	5,0
Твін-80	1,0 см3
Амоній лимонно однозаміщений	2,0
Магній сірчанокислий 7-водний	0,1
Марганець хлористий 4-водний	0,05
Агар мікробіологічний	13,0 ± 2,0

Складова середовища представлена поживними компонентами, серед яких є пептони, певні екстракти тваринного та дріжджового походження, джерела вуглеводів та мінеральних елементів. Така основа сировини відповідає потребам вимогливим мікроорганізмам, а одночасно з цим відбувається процес пригнічення чужорідних організмів завдяки кислому pH та наявності сполук органічних кислот. Оптимальними вимогами для культивування є вирощування мікроорганізмів при 37°C в анаеростаті. Рекомендована наявність газпакету для постачання вуглекислого газу в концентрації близька 5-10%. Культивування відбувається протягом 48 годин.

Таблиця 2.4

Результати вирощування на середовищі Лактобакагарі деяких штамів [30]

Штам	Кількість інокулюму	Характер росту
Lactobacterium fermentum ATCC 9338	0,1 см3 із розведення 10^-5	Білі круглі колонії
Lactobacterium brevis ATCC 367	0,1 см3 із розведення 10^-5	Білі круглі колонії

На середовищі утворюються колонії лактобактерій сірого, білого або напівпрозорого кольору, круглої гладкої форми. Мають діаметр не менше 1 мм. Інколи колонії мікроорганізмів можуть утворюватися шорсткими або сплющеними. У разі посіві бактерій у товщу середовища, колонії зазвичай мають білий колір та сочевицеобразну форму. Лактобакагар здатен зупиняти ріст *Pseudomonas, E. coli* та деяких інших видів бактерій.

3. Середовище Блікфельдта – використовують для накопичення молочнокислих бактерій та їх ідентифікації (табл. 2.5, 2.6) [32].

У 800 см дистильованої води розчиняють 10 г лактози, 10 г глюкози, 5 г пептона, кип'ятять і фільтрують через паперовий фільтр. До фільтрату додають 4 г дріжджового екстракту або 20 см розчину дріжджового екстракту, 10 см розчину бромкрезолпурпура, встановлюють pH (7,3 ± 0,1), розливають в стерильну посуд і стерилізують при температурі (117 ± 1) ° С не більше 20 хв. [17].

Поживне середовище володіє високими ростовими характеристиками. Для росту молочнокислих бактерій на даному середовищі використовують чисту культуру мікроорганізмів, бо у складі середовища немає селективних агентів, і інгібування чужорідних організмів не відбувається. Особливістю є наявність бромкрезолового пурпурного індикатора, який сприяє виявленню продуктів життєдіяльності лактобактерій. При синтезі кислот колір середовища змінюється з фіолетового на жовтий. Оптимальною умовою для вирощування мікроорганізмів є температура 37° С протягом 48 годин.

Таблиця 2.5

Склад середовища Блікфельдта

Компонент	Склад (г/л)
Глюкоза	10
Лактоза	10
Пептон ферментативний	5
Дріжджовий екстракт	4
Бромкрезоловий пурпурний	0,01

Таблиця 2.6

Результати вирощування на середовищі Блікфельдта деяких штамів [33]

Штам	Кількість інокулюму	Характер росту
Lactobacterium fermentum АТСС 9338	0,1 см3 із розведення 10^-5	Пожовтіння середовища
Lactobacterium brevis АТСС 367	0,1 см3 із розведення 10^-5	Пожовтіння середовища

4. Модифіковане печінкове середовище Блаурокка (табл. 2.7) – призначене для виділення і культивування біфідобактерій [34]. Середовище Блаурокка – це середовище лабораторного виготовлення. Кожна лабораторія, як правило, готує її самостійно невеликими партіями [35].

Свіжу яловичу печінку кількістю 0,5 кг очищають від плівок і протоків, подрібнюють, заливають 1 л дистильованої води і кип'ятять протягом 1,5-2 ч. Відвар профільтровують, доводять до 1 л дистильованою водою. Додають на 1 л розчину: хлористого натрію - 5,0 г, пептона - 10,0 г. Встановлюють активну кислотність (8,15 ± 0,05) од. pH за допомогою 10%-ного розчину гідроксиду натрію. Кип'ятять 10 хв. Стерилізують при температурі (121 ± 3) ° С протягом (15 ± 1) хв або при температурі (112 ± 5) ° С протягом (30 ± 1) хв. На наступний день печінковий бульйон зливають,

звільнивши від осаду, доливають дистильованою водою до 1 дм. Вносять на 1 дм бульйону: глюкозу - 5,0 г, агар - 0,8 г, цистеїн - 0,3 г [34].

Середовище розливають по флаконах 50 - 100 см3 і стерилізують 50 хв текучим паром і 30 хв при 0,5 атм. Перед вживанням середу розливають в пробірки по 10 - 15 см3 і прогрівають на водяній бані 40 хв при 100 ° С. Показники середовища: амонійний азот - 70 - 80 мг%, pH = 7,2 - 7,4 [36].

Таблиця 2.7

Склад середовища Блаурокка

Компонент	Склад (г/л)
Печінкова вода	1000 см3
Пептон сухий	10
Натрія хлорид	5
Глюкоза	5
Агар мікробіологічний	0,8
Цистеїн	0,3

2.1.2. Властивості біологічних агентів – *Lactobacillus rhamnosus* та *Lactobacillus helveticus*

У якості біологічного агенту для препарату Лацидофілу використовують такі мікроорганізми як *Lactobacillus helveticus* та *Lactobacillus rhamnosus.*

Бактерії роду *Lactobacillus* беззаперечно є незамінними об’єктами, що застосовуються для створення ферментованих продуктів в якості консервантів натурального походження. На даний момент можна зробити висновок, що такі продукти представляють перспективну частину ринку, яка з кожним днем зростає все більше і більше. І саме штами лактобактерій серед інших молочнокислих бактерій найбільше та найчастіше використовуються для створення специфічних препаратів.

Рід *Lactobacillus* відноситься до відділу *Firmicutes*, класу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, родини *Lactobacillaceae* [37, 38]. Бактерії роду *Lactobacillus* –

грампозитивні, нерухомі та не здатні до спороутворення бактерії. Певні штами можуть відноситися до суворих анаеробів і до факультативних анаеробів, виходячи зі шляху використання кисню. За формою це невеликі та продовгуваті палички або коки, розміри яких варіюються в залежності від типу поживного середовища та його складу. За загальним шляхом перетворення глюкози та інших гексоз та сахаридів бактерії роду *Lactobacillus* належать до класу гомоферментативних мікроорганізмів, які в кінці збродження продукують близька 85% молочної кислоти і лише невеликий процент інших сполук: етилового спирту, янтарної та фумарової кислот і т.д. Особливістю є те, що мікроорганізми *Lactobacillus* здатні поводитися як гетероферментативні організми, використовуючи окисний пентозофосфатний шлях зброджування глюкози з утворенням оцтової кислоти.

Особливостями лактобактерій є стійкість до кислот, що дозволяє їм розвиватися в підкислених середовищах, з pH близька 5,4-6,4. Ріст культури сповільнюється при досягненні pH 3.6-4.0 в залежності від виду та штаму. *L. suebicus, L. casei і L. plantarum* зберігають здатність до росту навіть при pH 2.8. У лужних і нейтральних середовищах зростання лактобацил як правило сповільнюється [38]. Більшість лактобактерій є негативними до каталази, однак окремі види мікроорганізмів здатні проявляти псевдокаталазну активність.

До лактобактерій, що відносяться до постійної мікробіоти людини, входять види: *L. salivarius L. gasseri, L. ruminis, L. crispatus, L. reuteri,* і становлять лише до 0,6% кількості мікроорганізмів. Певні штами *L brevis, L. casei, L. plantarum, L. delbrueckii, L. rhamnosus* та деяких інших лактобактерій можна також зустріти в кишковику хозяїна, однак вони не являються стабільними та постійними представниками мікробіоти. Специфічними видами, що переважають в кишковику новонароджених дітей, є молочнокислі бактерії *L. rhamnosus, L. salivarius* та *L. paracasei*. Саме синтезована за допомогою пробіотичних мікроорганізмів молочна кислота несе великий антимікробний вплив.

Мікроорганізми роду *Lactobacillus* відомі за синтезом особливих речовин – бактеріоцинів. Ці сполуки є пептидами, обумовленими антибактеріальними властивостями, та майже завжди обмежені дією на близькі за походженням бактерії

або мікроорганізми, які знаходяться в споріднених нішах. Дія бактеріоцинів базується на тому, що ізоелектрична точка таких білкових молекул знаходиться в межах лужного pH, за рахунок чого мембрани чужорідних бактерій стають більш проникні, і всі необхідні для підтримки життєздатності молекули виходять із клітини. Загалом вважається, що бактеріоцини є реакцією на конкурентну боротьбу за поживні речовини в середовищі [39].

Іншими відомими захисними механізмами *Lactobacillus* є синтез пероксиду водню, продукування цитопротективних протеїнів, утворення муцину в якості підсилення бар'єру клітини та процес апоптозу епітеліального шару.

Біологічний агент препарату Лацидофіл складається 2 культур: *L. rhamnosus (*табл. 2.8*)* та *L. helveticus (*табл. 2.9*)*.

Таблиця 2.8

Наукова класифікація мікроорганізму *L. rhamnosus* [37]

Домен	*Bacteria*
Відділ	*Firmicutes*
Клас	*Bacilli*
Порядок	*Lactobacillales*
Родина	*Lactobacillaceae*
Рід	*Lactobacillus*
Вид	*L. helveticus*

Культура *L. rhamnosus* відноситься до транзиторного та тимчасового виду мікроорганізмів кишковику людини та використовується для покращення імунного захисту та нервового стану організму, а також при лікуванні хвороб, викликаних дріжджами роду *Candida*. Вона використовується у всьому світі з 1990 р. в якості інгредієнта в харчових продуктах і дієтичних добавках. Численні дослідження показали, що прийом препаратів з культурою *L. rhamnosus* знижує такі побічні ефекти антимікробного лікування, як болі в животі, а також клінічно доведено запобігає

антибіотик-асоційовану діарею, здатна надавати імуномодулюючі ефекти та протиалергічну дію [40].

Таблиця 2.9

Наукова класифікація *L. helveticus* [37]

Домен	*Bacteria*
Відділ	*Firmicutes*
Клас	*Bacilli*
Порядок	*Lactobacillales*
Родина	*Lactobacillaceae*
Рід	*Lactobacillus*
Вид	*L. helveticus*

Клітини *L. rhamnosus* ростуть на багатьох інших середовищах окрім кишковику, так як мають високу адаптаційну здатність.

Культура *L. rhamnosus* використовують також у виробництві молочнокислих продуктів у якості закваски та для отримання таких твердих сирів як Емментальский, Честер, Едам та інші.

Особливістю культури *L. helveticus* є здатність утворювати в сирних продуктах горіхові аромати. Ці мікроорганізми разом з культурою пропіоновокислих бактерій роду *Propionibacterium* використовують з метою створення в ароматизованих сирах спеціальних отворів за рахунок продукування CO2 [41].

Штами *L. helveticus* виділені із молочних продуктів: сиру Емменталь, Груєр, різних сирних продуктів та скислого молока. Також культура мікроорганізмів може бути ізольована з телячого сичуга.

Основною перевагою *Lactobacillus helveticus* є відновлення середньої кількості КУО в кишковику та сильна та продуктивна ферментація, що позитивно впливає на продукування в кишковику молочнокислих бактерій з метою підвищення функціонування організму.

2.1.3. Основні типи обладнання

Глибинне культивування проводять в вертикальних ємностях різного розміру, які називаються ферментаторами. Базова вимога: можливість проведення культивування в асептичних умовах.

Біореактори класифікуються на твердофазні (використовується щільне, в'язке або напіврідке середовище) і рідкофазні (рідке середовище). Твердофазні реактори поділяються на біореактори типу лотка, біореактори типу обертового барабана, коливальні біореактори, біореактори з мішалкою, повітряні біореактори [42].

Існуючі промислові ферментатори за способом підведення енергії і перемішування можна розподілити на такі групи: апарати з механічним перемішуванням і барботажем (комбіновані); з ежекційною системою аерації (підведення енергії до рідкої фазі) і барботажні (підведення енергії до газової фази). Для ферментної промисловості найбільший інтерес представляє перша група апаратів, призначена для асептичних процесів. Ці апарати мають циліндричну форму і відрізняються за обсягом, обертовим валом і теплообмінними пристроями. Максимальний обсяг таких біореакторів становить 2 000 л. Фірма «Хемап» має в своєму розпорядженні впровадженими розробками герметичних ферментаторів місткістю до 360-400 м3 [43].

З вітчизняних апаратів найбільш широко використовуються герметичні ферментатори місткістю 50 м3 і місткістю 100 м3.

Апарати розраховані для роботи під надлишковим тиском 0,25 МПа і стерилізації при температурі 130-140 ° С. Передбачені торцеві ущільнення валу, що дозволяє практично повністю запобігти витоку середовища або потрапляння повітря в порожнину апарата в місці виходу з нього валу для забезпечення асептичних умов процесу [42].

Важливим фактором процесу є правильна обв'язка біореактора. Це включає підведення всіх комунікацій з урахуванням можливості стерилізації.

Всі існуючі ферментатори забезпечені спеціальними пристроями для введення піногасника і контролю висоти піни в апараті.

У процесі культивування також ведеться постійний контроль за накопиченням ферментів, станом біомаси продуценту, pH середовища, споживанням деяких складових середовища і т. д. Після закінчення культивування культуральна рідина подається або безпосередньо у виробництво, де вона використовується, або на відділення рідкої фази від біомаси.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Визначення біомаси

Важливою операцією в процесі періодичного культивування є зупинка росту мікроорганізмів в межах початку стаціонарної фази, яка характеризується настанням періоду своєрідної рівноваги. В стаціонарній фазі рівень продукуємих мікроорганізмів знаходиться на тому же рівні, що і кількість вже загиблих бактерій, а згодом розвиток зупиняється через процеси пригнічення культури або нестачі субстрату. Зупинка на конкретній фазі контролює розвиток мікроорганізмів та затримує їх на необхідний період часу в цьому стані.

Існують певні методи визначення біомаси, серед яких виділяють:

- Кондуктометричний;
- Ваговий;
- Турбідиметричний.

1. Кондуктометричний метод. Ріст бактерій на субстраті супроводжується виникненням та поступовим збільшенням кількості окремих іонних метаболітів, які можна фіксувати за допомогою спеціальних приладів (рис. 2.1).

Рис. 2.1. Приклад лічильнику Култера [44]

Такий метод характеризується на фіксації рівня провідності та опору субстрату в залежності від кількості клітин, що містяться в ньому. В середовищі відбувається зсув електрохімічних характеристик через наявність заряджених частинок у ньому. Реєструють такі зміни в опорі спеціальні електроди приладів, які повинні знаходитися в безпосередньому контакті з досліджуваною речовиною. Різні типи мікроорганізмів характеризуються індивідуальними особливостями зміни електрохімічних показників середовища. Як приклад, цвілеві гриби та дріжджі не здатні сильно впливати на опір в субстраті. Ця проблема вирішується непрямими методами визначення провідності. Для цього застосовують джерела неорганічної сполуки – гідроксиду калію.

Одним з найбільш вживаних приладів для фіксації рівня накопичення біомаси є електронний лічильник Култера [44].

Суспендовані в розчині слабкого електроліту частки проходять через отвір (апертуру) малого діаметра. Апертута розділяє два електроди, між якими протікає електричний струм. У просторі апертури виникає так звана "чутлива зона", проходячи

через яку, кожна частка або клітина витісняє певну кількість електроліту, викликаючи стрибкоподібне зростання опору [44].

Таким чином за стрибком напруги після перетворення даних в зрозумілі для людини одиниці об'єму можна визначити і розміри заряджених частинок. Великою перевагою кондуктометричного методу є розподіл мікроорганізмів в культурі за розмірами та доступна фіксація рівня клітин в біомасі.

2. Ваговий метод. Метод застосовується для визначення біомаси, культивованої в рідких поживних середовищах або в окремих випадках – на щільному середовищі. Метод базується на аналізі приросту біомаси по сирій або сухій масі та може включати в себе такі етапи як:

1. Попереднє визначення маси пробірок центрифуги;

2. Центрифугування культуральної рідини;

3. Визначення ваги отриманої біомаси.

Під час центрифугування відбирають невелику частину культуральної рідини у різні пробірки та центрифугують окремо протягом 15-20 хв. При 10 тис. об/хв. Після цього утворений супернатант зливають [45].

Вагу біомаси перераховують за формулою:

$$\mathrm{M} = \frac{(\mathrm{A} - \mathrm{B})}{V} \cdot 1000$$

M – вага сирої біомаси, г/л;

A – вага центрифугованої пробірки з осадом, г;

B – вага центрифугованої пробірки без осада, г;

V – об'єм культуральної рідини, взятий для центрифугування, см3.

В іншому разі, якщо визначають вагу по сухій біомасі, необхідно доводити вагу центрифугованих пробірок до стабільного значення в сушильній шафі. Такий процес може проходити при температурі 80-85° С або 90-100°С і тривати 1-2 години.

3. Турбідиметричний метод. Каламутність мікробної суспензії може бути визначена шляхом вимірювання оптичної щільності при певній довжині хвилі.

Інтенсивність пучка світла, що проходить через пробу, зменшується за рахунок розсіювання (нефелометрія) або поглинання світла (турбідиметрія). Процеси

розсіювання та поглинання світла залежать не тільки від кількості клітин в суспензії, але також від їх розмірів і форми. Для більш концентрованих суспензій застосовують турбидиметричний метод [46].

Для цього методу на фотоелектроколориметрі (рис. 2.2) [47] або спектрофотометрі (рис. 2.3) [48] обирають довжину хвилі в межах 540-650 нм. При такій довжині хвилі поглинання світла є мінімальним.

Рис. 2.2. Приклад фотоелектроколориметру AP-120 APEL [47]

Рис. 2.3. Приклад спектрофотометру V-1200 [48]

При випробуванні пробу яскраво висвітлюють, а потім вимірюють інтенсивність минулого випромінювання або випромінювання, розсіяного під певним кутом. Для визначення кількості клітин в середовищі використовують калібрувальний графік, що відображає залежність між величиною розсіювання і числом клітин в одиниці об'єму суспензії. Для побудови калібрувального графіка вимірюють величину світлорозсіювання в ряді проб з відомим вмістом клітин. Калібрувальні графіки індивідуальні для кожного мікроорганізму [46].

2.2.2. Визначення протеолітичної активності

Така варіація отримання значень протеолітичної активності базується на модифікації визначення за Kunitz [49]. Принцип полягає в підрахунку продуктів розкладу білків, що не осадились внаслідок реакції з трихлороцтовою кислотою.

Основою субстрату являється сполука казеїну в калій або натрій фосфатному буфері (являє собою розчин солей, який містить хлориди, гідрофосфати, дигідрофосфати відповідних елементів). Рівень pH цієї суміші повинен знаходитись на рівні 8,0 при 25°C. Важливо переконатися, що розчинення казеїну в буферній

речовині відбулося повністю. Такий субстрат можна зберігати до 10 діб, при 5-7°С та повній темряві.

Для визначення протеолітичної активності беруть досліджувану речовину та додають до неї фосфатний буфер, після чого суміш передається до термостата з температурою 37°С, де знаходиться протягом десяти хвилин. Після того як речовину достають із термостату, до неї одразу доливають розчин казеїну у рівному співвідношенні. Завершується процес вливанням 10% розчину трихлороцтової кислоти по закінченню півгодини від попередньої реакції. Утворену речовину піддають фільтрації за допомогою фільтрувального паперу для середніх частинок через 10-15 хвилин. Після завершення фільтрації відбувається визначення оптичної щільності, для чого використовується такий апарат як спектрофотометр. Визначення оптичної щільності відбувається при 280 нм.

Налаштування приладу відбувається за спеціально підготовленим контрольним розчином. До нього входять у рівних співвідношеннях 10% розчин трихлороцтової кислоти та фосфатний буфер.

Протеолітичну активність (ПЕ / мг) розраховують за формулою [50]:

$$ПА = \frac{(Доп - Дк) \cdot \sum V \cdot Vк}{g \cdot Кт \cdot Vф \cdot t}$$

де Доп – оптична щільність дослідної проби;

Дк – оптична щільність контрольної проби;

∑V = (V ф + Vфб + Vказ + Vтху) – сума обсягів розчинів: досліджуваної речовини, фосфатного буфера, казеїну, трихлороцтової кислоти (∑V = 10 см3);

Vк – обсяг колби, в якій розчиняли наважку досліджуваної речовини, масою g мг;

Кт – тирозиновий коефіцієнт = 1,20 опт. Од 280нм · см3/мкМ тирозину;

t – час інкубації в хвилинах.

2.2.3. Потенціометричний метод визначення кислотності

Потенціометричний метод може проводитися двома шляхами: пряма потенціометрія (рис. 2.9) та потенціометричне титрування. Даний метод потенціометричного титрування побудований на аналізі електродного потенціалу шляхом нейтралізації за допомогою розчином NaOH сполук, що присутні в досліджуваній речовині. Для цього використовуються гальванічні апарати з двома електродними елементами, за якими і можна прослідкувати різницю потенціалів розчинів. Проводиться нейтралізація спеціальним приладом автоматичного титрування, а за допомогою аналізатора – визначається точка еквівалентності.

Послідовність визначення кислотності включає змішування досліджуваного розчину об'ємом 10 см3 та дистильованої води об'ємом 20 см3 у спеціальній посудині на 50 см3. Електроди встановлюються в досліджувану рідину, після чого вмикають магнітну мішалку, на якій повинна бути розташована посудина з аналізуємим продуктом. Також в посудину з досліджуваною речовиною поміщується трубка дозатора приладу автоматичного титрування. Якщо електроди при даній пропорції залишаються неповністю покриті рідиною, можна додати ще дистильовану воду.

Далі вмикається прилад для титрування, під час цього процесу у посудину з речовиною додається NaOH, та відбувається нейтралізація. Етап надходження розчину натрій гідроксиду припиняється, як тільки досягається точка еквівалентності. Після цього вимикається апарат та відбувається перерахунок речовини-титранту, який був витрачений на процес нейтралізації [51].

Кислотність в градусах Тернера знаходять множенням обсягу, см, розчину гідроксиду натрію, витраченого на нейтралізацію певного обсягу продукту, на наступні коефіцієнти [51]:

10 – для молока, вершків, кефіру, і інших кисломолочних продуктів;

20 – для сиру, сметани і сирних виробів.

Межа похибки результату вимірів при прийнятої довірчої ймовірності = 0,95 становить, °Т [51]:

± 0,8 – для молока, вершків, морозива;

± 1,2 – для кислого молока, кефіру, і інших кисломолочних продуктів;

± 2,3 – для сметани;

± 3,2 – для сиру і сирних виробів.

Найбільш вірним варіантом результату буде середнє значення двох послідовних аналізів. Середнє арифметичне округлюється до другого десяткового знаку.

2.2.4. Метод визначення граничної кислотності

Метод визначення граничної кислотності базується на нейтралізації кислот досліджуваної речовини за допомогою NaOH. Індикатором для проведення цього процесу слугує фенолфталеїн. Кислотність продукту є обернено пропорційною до характерного кольору забарвлення розчину, що утворюється внаслідок реакції нейтралізації.

Найголовнішим етапом для проведення цього методу є приготування спеціальних робочих розчинів.

У мірну колбу відмірюють необхідний обсяг розчину гідроксиду натрію відповідно до вимог табл. 2.11, додають 10 см фенолфталеїну і дистильовану воду до мітки. В ряд пробірок вносять по 10 см розчину гідроксиду натрію, приготованого для визначення відповідного градуса кислотності. В кожну пробірку з розчином доливають по 5 см продукту і вміст пробірки перемішують шляхом перевертання. Якщо вміст пробірки знебарвлюється, то кислотність даної проби продукту буде вище відповідного даного розчину градуси [52].

Таблиця 2.10

Вимоги до визначення граничної кислотності [51]

Обсяг розчину гідроксиду натрію	80	85	90	95	100	105	110
Кислотність, °Т	16	17	18	19	20	21	22

Обсяг використовуємого для нейтралізації 100 г продукту NaOH (концентрації 0,1 моль/дм) відповідають градусам Тернера.

2.2.5. Визначення сирого протеїну методом Кьельдаля

Метод Кьельдаля використовується для визначення сполук амінів та азоту в амідній формі. Для цього процесу застосовується реакція між сірчаною кислотою та досліджуваною речовиною, у якості каталізатора виступає селен, внаслідок чого відбувається мінералізація та утворюється сполука амонію сірчанокислого. Остаточну кількість протеїну визначають шляхом відгонки амоніаку в кислоту по рівню азоту в речовині [53].

Для досліду використовується колба Кьельдаля, в яку додають приблизно 0,5 г наважки досліджуваної речовини та проводять реакцію з сірчаною кислотою в присутності селенового каталізатора. Посудина поміщається на окрему електричну плиту та витримується до остаточного знебарвлення речовини. Аналізований продукт охолоджують та за допомогою дистильованої води в окремій посудині доводять до об'єму в 100 см3. Наступний етап представлений відгонкою сполуки аміаку на спеціальному пристрої. Сама відгонка проводиться приблизно протягом півгодини, для цього у приймач додають реактив Конвея в об'ємі 10 см3, а у перегінну колбу поміщають досліджувану речовину з 40% розчином NaOH також в об'ємі 10 см3. Внаслідок перегонки на апараті Кьельдаля утворюється сполука бората амонію, через реакцію між реактивом Конвея, до якого входить борна кислота, та утвореним аміаком. Відбувається титрування утвореної речовини за допомогою 0,05 н H2SO4. При цьому титруванні зелений колір речовини переходить у вихідний.

Для розрахунку загального азоту (N,%) використовується формула [54]:

$$N = \frac{\mathrm{V} \cdot 0{,}05 \cdot 14 \cdot 100}{\mathrm{H} \cdot 10} \cdot 100$$

де N – вміст азоту в пробі;

V – обсяг сірчаної кислоти, витраченої на титрування (см3);

0,05 – концентрація титранту (мг-екв / см3);

14 – кількість азоту (мг), яке пов'язує 1 мг-екв сірчаної кислоти;

100 – об'єм розчину в мірній колбі (см3);

10 – кількість розчину, взятого для відгону аміаку (см3);

H – наважка матеріалу (мг).

Для перерахунку у відсоток сирого протеїну використовують емпіричні коефіцієнти, які відповідають типу речовини, в якій і визначається вміст білка. Наприклад, формула:

$$X = N \cdot 5{,}7$$

де 5,7 є емпіричним коефіцієнтом, який відповідає продуктам переробки вівса, пшениці і т.д.

2.3. Висновки до розділу

При виробництві біопрепаратів пробіотиків однією з найважливіших проблем є отримання найбільшої кількості якісної біомаси культивованих мікроорганізмів. Для досягнення цієї мети необхідні збалансовані поживні середовища. Лактобактерії вимогливі до штучних поживних середовищ. Для стимуляції їх росту в поживне середовище вносять різні добавки: дріжджовий екстракт, твін-80, дріжджовий автолізат, який містить цінні розчинні форми білка і вітаміни групи В. Відома значна кількість виробничих поживних середовищ для культивування і виділення біфідобактерій, такі як кукурудзяно-лактозне середовище (КЛС), MRS – бульйон, середовище «Біфідум», і цілий ряд інших. Біологічними агентами препарату є бактерії *Lactobacillus helveticus* та *Lactobacillus rhamnosus*.

Для контролю перебігу накопичення біомаси застосовують кондуктометричний метод визначення кількості клітин, потенціометричний метод визначення кислотності, метод визначення граничної кислотності, а також може застосовуватися метод визначення сирого протеїну за Кьельдалем та визначення протеолітичної активності.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* та *L. helveticus*

Мікроорганізми *Lactobacillus rhamnosus* (рис. 3.1) на твердому середовищі утворюють колонії сферичної форми, непрозорого, сіруватого кольору. Колонії дрібні, зазвичай не більше 4 мм.

Рис. 3.1. Колонії бактерій *L. rhamnosus*

Клітини при збільшенні представлені у вигляді нерухомих паличок з округлими кінцями, розмірами від 0,8-1,0 до 2,0-4,0 мкм. Існують у ланцюгах або поодиноко розташовані (рис. 3.2).

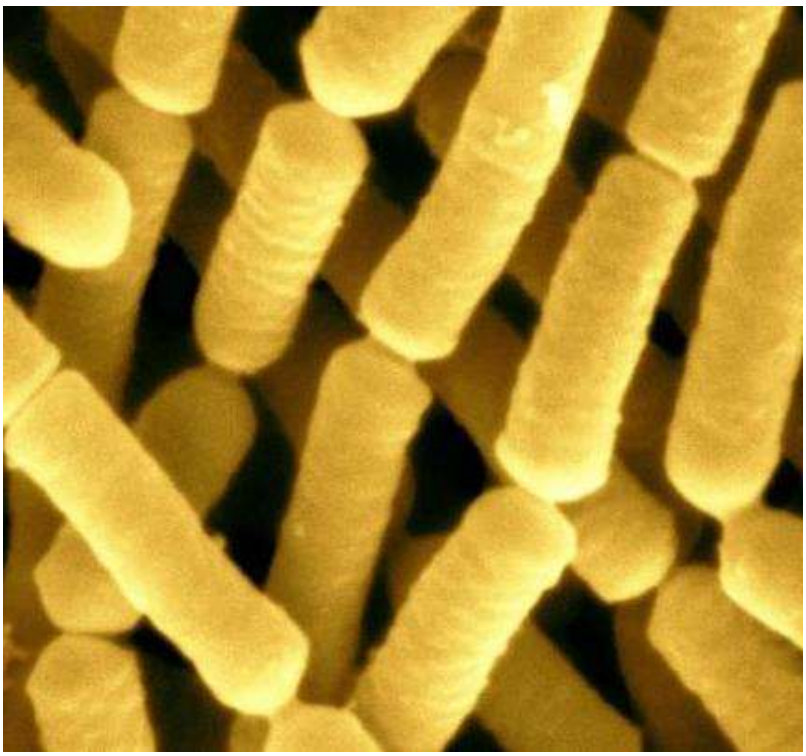

Рис. 3.2. Бактерії *L. rhamnosus, ×10000*

У порівнянні з мезофільними бактеріями роду *Lactococcus* протеолітична активність культури *L. rhamnosus* в два рази вище. Гранична кислотність в молоці дорівнює 80-180° Т [55].

Бактерія *L. rhamnosus* відноситься до гетероферментативного типу молочнокислого бродіння (рис. 3.3). Кінцевими продуктами при цьому бродінні є не тільки молочна кислота, але і побічні продукти: оцтова кислота, етиловий спирт, бурштинова кислота, діоксид вуглецю, водень. Культура не гідролізує аргінін, а також є уреаза-негативною.

Товстий шар пептидоглікану разом з аміноцукровим полімером утворює міцну клітинну стінку мікроорганізму, яка являється захисним бар'єром від осмотичних різниць внутрішнього та навколишнього середовища, а також надає постійну форму клітині.

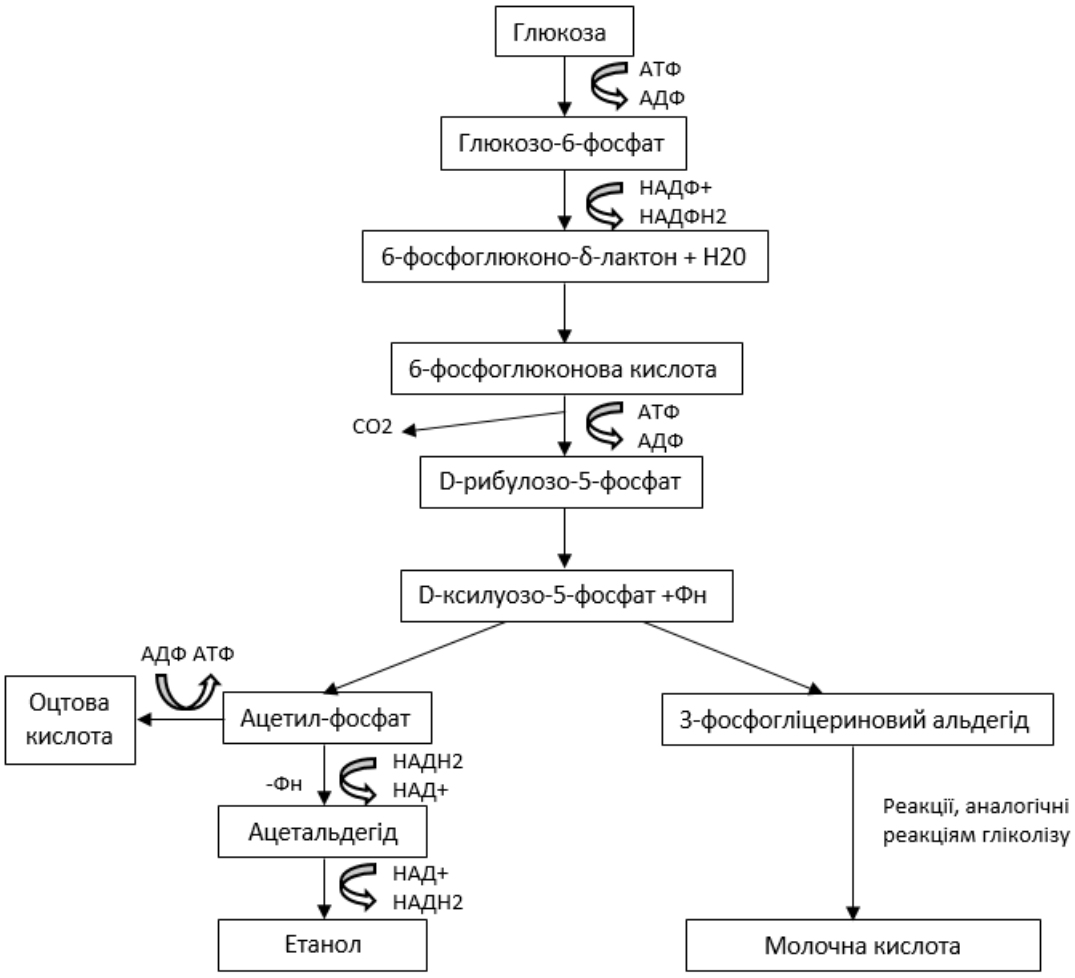

Рис. 3.3. Схема гетероферментативного молочнокислого бродіння

Мікроорганізми *Lactobacillus helveticus* (рис. 3.4), які відомі під назвою «швейцарська паличка», утворюють в’язкі колонії сіруватого кольору і невеликого розміру на лактозному агарі.

Рис. 3.4. Колонії бактерій *L. helveticus*

Клітини при збільшенні представлені у вигляді нерухомих паличкообразних клітин, розміри яких варіюються від 0,7-0,9 до 6,0 мкм. Клітини *L. helveticus* здатні знаходитися як у ланцюгах, так і розташовуватися поодиноко (рис. 3.5).

Температура 50-52° С є верхньою межею при культивуванні культури *L. helveticus*. Оптимальна температура росту дорівнює 42-45° С. Молоко згортає за 5-6 год, гранична кислотність становить 300-350 Т [55]. Культура не гідролізує аргінін та має гомоферментативний шлях зброджування (рис. 3.6).

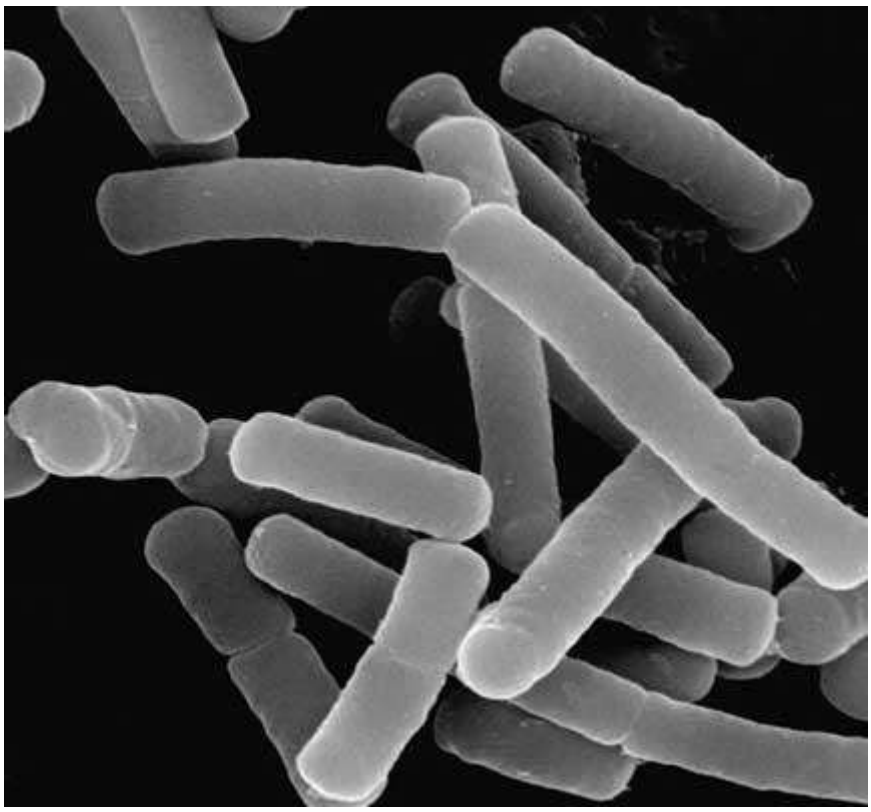

Рис. 3.5. Молочнокислі бактерії *L. helveticus*, ×10000

Для росту культури *L. helveticus* необхідні такі компоненти як вітаміни B2 (рибофлавін), B3 (ніацин або нікотинова кислота), B5 у вигляді пантотенату кальцію та B6 (піридоксамін). Вітаміни B1 (тіамін), B9 (фолієва кислота), B12 (кобаламін) та тимідин є не важливими факторами росту.

$$C6H12O6 + 2\text{Фн} + 2\text{АТФ} \rightarrow 2CH3 - CO - COOH + \text{НАДН2} \rightarrow$$

Глюкоза Піруват

$$\rightarrow 2CH3 - CHOH - COOH + 4\text{АТФ} + 2H2O + \text{НАД} +$$

Молочна кислота

Рис. 3.6. Гомоферментативне бродіння

3.2. Підбір поживного середовища для вирощування культури *L. rhamnosus*

В процесі виробництва пробіотиків велика увага приділяється синтезу якісної біомаси. Для даного процесу підбирають поживні середовища, які відповідають всім необхідним вимогам для росту та життєдіяльності мікроорганізмів. Як відомо,

бактерії роду *Lactobacillus* є дуже вибагливими до складу середовища, на якому вони ростуть. Одною із причин цього є те, що вони відносяться до ауксотрофних організмів. Тому в поживне середовище додають різноманітні добавки для якісної стимуляції росту. Це можуть бути різні екстракти, наприклад, дріжджовий екстракт; вітаміни групи В, твін-80, дріжджові автолізати, пептиди та окремі види специфічних амінокислот, наприклад цистеїн солянокислий або L-аргінін солянокислий. На ріст мікроорганізмів впливає як наявність компонентів різної ступені гідролізу протеїнів, тобто пептидів, амінокислот та інших варіацій сполук, так і наявність самого білка.

В компонентах на основі сої містяться такі речовини як стахіоза та рафіноза, що являються речовинами олігосахаридної природи, та різні ізофлавони поліфенольного походження. Такі пребіотичні компоненти здатні прискорювати та покращувати ріст мікроорганізмів.

Великий вплив на ріст молочнокислих бактерій також дає ряд буферних солей, таких як цитрат натрія, ортофосфат натрія та ацетат натрія. Саме тому вважається, що на відміну від звичайного знежиреного молока через менший рівень буферної ємності сироватка має менш сприятливий ефект на накопичення клітин. Середовище MRS, як і казеїново-дріжджове, має у складі дріжджовий автолізат, який являє собою суспензію та не відноситься до технологічної складової. Поділ такої суспензії на фази потребує наявності складних та дорогих приладів. Також існують речовини, які в якості складових поживного середовища здатні підвищувати загальну вартість, наприклад імпортний цистеїн у складі казеїново-дріжджового середовища. Джерела марганцю, фосфору, ряду металів; ацетат натрію, хлорид натрію, двозаміщений цитрат амонію використовуються для вихідної сировини у якості джерел мікроелементів, що також необхідні для продукування молочнокислих бактерій. Саме тому важливо слідкувати за вмістом поживного середовища і перевіряти його на наявність необхідних елементів у відповідних кількостях.

Найчастіше для культивування лактобактерій використовують сировину тваринного походження для надання середовищу всіх зазначених компонентів. В якості такої сировини можуть бути гідролізати знежиреного молока, м’ясні екстракти

та пептон із казеїну у сухій формі. Перспективною є заміна продуктів тваринного походження рослинами. Прикладом є використання капустяного середовища [56].

Загалом кількість поживних середовищ з рослинної сировини для росту та життєдіяльності молочнокислих бактерій, є невеликою, однак ці середовища є дуже перспективними. Перевага такої сировини полягає у різниці собівартості речовин тваринної природи та рослинного походження.

Існує ряд найбільш відомих поживних середовищ, що використовуються під час виробництва молочнокислих бактерій. До них відносяться MRS бульйон, кукурудзяно-лактозне середовище, середовище Блікфельдта та інші. Лактоза є основою вуглеводного джерела, а пептони і рослинні або тваринні компоненти є джерелами амінів для середовищ культивування лактобактерій. Перспективним з економічної точки зору є використовувати кукурудзяно-лактозне середовище у виробничих процесах через собівартість та наявність олігосахаридів і харчових волокон у якості своєрідного пребіотику у складі для підвищення росту мікроорганізмів. З метою визначення кількісного обліку лактобактерій використовують агаризовані поживні середовища: гідролізоване або знежирене молоко.

Якісне середовище повинно містить у собі всі необхідні фактори росту та мати багату білкову основу для забезпечення стабільного росту і прояву всіх морфологічних та фізико-хімічних властивостей молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* та *L. helveticus,* які є біологічними агентами препарату Лацидофіл. Для їх росту мікроорганізмів необхідна наявність в середовищі певних сумішей амінокислот (особливо аргініну, лейцину, тирозину, цистеїну, фенілаланіну, валіну, триптофану та глутамінової кислоти [57]), кислотних або ферментативних гідролізатів протеїнів казеїну, борошна або м’яса, а також наявність вітамінів. Найбільш важливими для молочнокислих бактерій вважаються вітаміни групи В, тому використовують такі добавки до поживних середовищ, як дріжджовий автолізат, екстракт рослинного походження із моркви, кукурудзи та інших сполук [57].

Моносахариди та дисахариди є основними джерелами енергії бактерій роду *Lactobacillus.* Прикладом є сахароза, глюкоза, лактоза. Як джерело азоту ці культури

використовують азот з органічних сполук, однак у разі недостатнього рівня органічних форм лактобактерії також можуть використовувати мінеральні сполуки азоту для продовження процесу синтезу. Амонійні солі являються ростовим фактором для окремих видів бактерій роду *Lactobacillus* [52]. Окрім цих сполук лактобактерії використовують лимонну, фумарову, піровиноградну, яблучну та інші органічні кислоти у якості джерел енергії для перебігу пластичного обміну (процеси анаболізму) [58].

Із неорганічних сполук необхідних для росту лактобактерій можна виділити йод, сірку, натрій, калій, фосфор, залізо, мідь, марганець та магній [59].

Найбільший вплив на якісний склад пробіотика припадає саме на культуру *L. rhamnosus*, бо 1 капсула цього препарату Лацидофіл містить 95% культури *L. rhamnosus* і лише 5% культури *Lactobacillus helveticus*. Загальний вміст мікроорганізмів у одній капсулі – не менше $2x10^9$ КУО ліофілізованих бактерій.

Серед відомих та найбільш застосованих поживних середовищ для культивування культур *L. rhamnosus* та *L. helveticus* використовують середовище MRS, однак це багатокомпонентне середовище є високовартісним та його використання з економічної сторони є нераціональним, особливо для нарощування біомаси мікроорганізмів з метою отримання пробіотичного препарату. Перспективним є дослідження та впровадження у виробництво нових середовищ, які базуються на більш дешевій сировині.

Для культивування молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* були використані такі середовища: стандартне MRS, де джерелом вуглецю є глюкоза, а джерелом азоту – цитрат амонію, м'ясний бульйон та ферментативний пептон, а також збалансоване середовище MRS на соєвому борошні, де джерелом вуглецю є сахароза і глюкоза, а джерелом азоту є амінокислоти у складі протеїнів сої (табл. 3.1) [60].

Таблиця 3.1

Склад поживних середовищ для вирощування молочнокислих бактерій

Стандартне середовище MRS	Збалансоване середовище MRS	Склад (г/л)
Декстроза	Декстроза	20,0
Бактеріологічний пептон	Соєве борошно	10,0
М'ясний екстракт	М'ясний екстракт	8,0
Ацетат натрію	Ацетат натрію	5,0
Дріжджовий екстракт	Дріжджовий екстракт	4,0
K2HPO4	K2HPO4	2,0
Цитрат амонію	Цитрат амонію	2,0
Твін-80	Твін-80	1,0
Сульфат магнію	Сульфат магнію	0,2
Сульфат марганцю	Сульфат марганцю	0,05
Бактеріологічний агар	Бактеріологічний агар	10,0

Соєве молоко є базою для соєвого поживного середовища та являється унікальним джерелом великої кількості водорозчинних протеїнів, які насамперед містять ряд незамінних амінокислот, в тому числі лізин, метіонін, валін та інші. Більша частина ліпідів соєвого молока представлена саме ненасиченими жирними кислотами, які є незамінними субстратами для росту. Соя містить великий рівень заліза та калію, а також ніацину (вітаміну B3), що навіть перевищує рівень вмісту цих сполук у тваринному молоці та нараховує вітаміни E, A, C, D, вітаміни групи B: B1, B2, B6, B12. В цьому продукті наявні макро- та мікроелементи P, Ca, Na, Mg, Fe, Zn, F, I, які є важливими факторами росту для культури *L. rhamnosus*. В соєвому молоці присутні такі вуглеводи: сахароза, глюкоза, фруктоза, крохмаль, рафіноза, стахіоза, а також нерозчинні полісахариди у вигляді пектинових сполук та геміцелюлози [61].

3.3. Аналіз отриманих результатів дослідження

3.3.1. Результати культивування молочнокислої бактерії *L. rhamnosus* на стандартному та збалансованому середовищах MRS

Культури *L. rhamnosus* вирощували в колбах протягом доби при температурі 37 °С, pH 6,5 і кількість посівного матеріалу – 10%. у термостаті, клітин лактобактерій для посівного матеріалу була 10^9 КУО/см3. Результати накопичення біомаси культури *L. rhamnosus* на поживному середовищі MRS приведені на рис. 3.7.

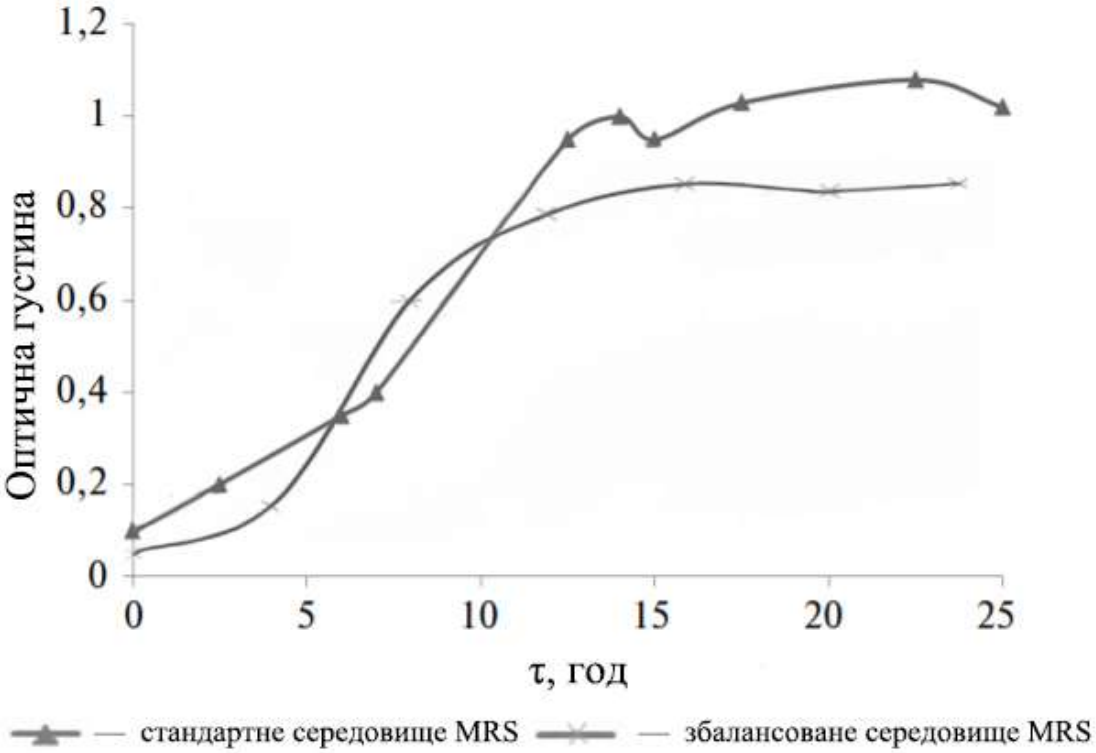

Рис. 3.7. Динаміка росту культури *L. rhamnosus* на стандартному середовищі MRS та збалансованому середовищі MRS [60]

В експоненціальній фазі в перші 12-13 годинах росту біомаса підвищується, а число нових мікроорганізмів пропорційно відповідає загальному числу популяції. Після цього культура переходить в стаціонарну фазу та поступово починає сповільнюватися її ріст із зменшенням кількості субстрату. Рівень біомаси досягає максимальної величини.

3.3.2. Залежність виходу біомаси від pH

Були досліджені оптимальні умови pH для поживного середовища на соєвому борошні, при якому можна досягти найбільш високого рівню виходу біомаси. На рис. 3.8. показано, що оптимумом є pH в області від 6,5 до 7,0, тоді як при досягненні pH 8,0 ріст молочнокислих бактерій практично повністю зупинявся. Для подальшого культивування мікроорганізмів *L. rhamnosus* на соєвому середовищі було обрано pH 7,0.

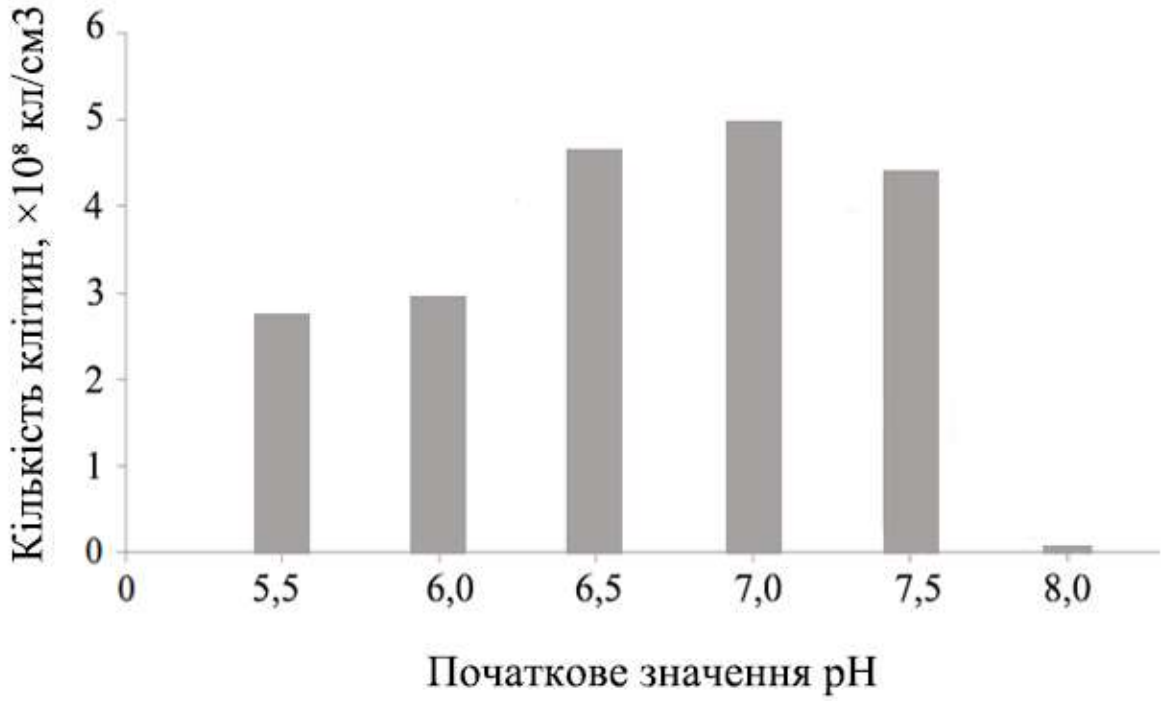

Рис. 3.8. Зміна кількості біомаси культури *L. rhamnosus* в залежності від pH

Далі проводили визначення оптимального рівня кількості посівного матеріалу, бо цей параметр безпосередньо відповідає за швидкість росту мікроорганізмів та наростання біомаси. На рис. 3.9. показана залежність виходу біомаси від кількості початкового посівного матеріалу. Відмічено, що при 2,5% молочнокислих бактерій від об’єму поживного середовища продукується менше клітин, ніж при 5% та 10%,

однак два останніх параметра дають біомасу приблизно на одному рівні і не відображають суттєвої різниці під час стаціонарної фази, тому заради економії ресурсів буде перспективно використовувати саме 5% посівного матеріалу.

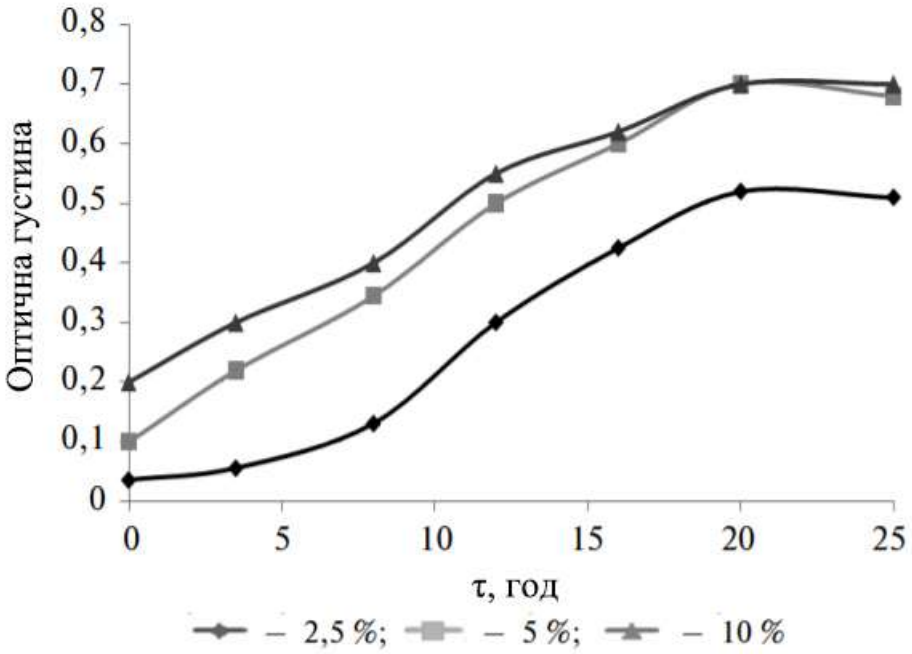

Рис. 3.9. Вплив кількості посівного матеріалу на ріст культури *L. rhamnosus* на соєвому поживному середовищі: — 2,5 %; — 5 %; — 10 % [60]

Аналізуючи отримані результати можна відмітити, що використання поживного середовища на основі соєвого борошна не є більш продуктивним за використання стандартного середовища MRS, однак завдяки ростовим факторам такий альтернативний субстрат показує перспективний рівень продуктивності по виходу біомаси, отже може бути обраним для зниження вартості виробництва на 10% [61]. Оптимальними показниками для росту культури *L. rhamnosus* на соєвому середовищі є pH середовища — 7,0, доза посівного матеріалу від об'єму поживного середовища — 5 % та температура культивування — 37 °C.

3.4. Вибір типу біореактора для культивування молочнокислих бактерій

Бродіння – це процеси, які спричиняють молочнокислі бактерії. Орієнтуючись на основні вимоги до такого роду культивування необхідно позначити оптимальну до

продуктивності завантажувальну здатність біореактора. Кількість клітин у перерахунку на один грам сухого носія відповідає межі від 10^8 до 10^{12}. Основною потребою на виробництві є визначення того рівня завантажувальної здатності, що дозволить продукувати необхідний рівень молочної кислоти, входячи з цільових об'ємів підприємства. Важливо слідкувати за швидкістю потоку речовин у біореакторі, температурою та іншими параметрами, що можуть вплинути на кількість біомаси. Необхідно приділяти велику увагу фільтрації повітря щоб запобігти окисленню речовин. Конкретні постійні умови повинні зберігатися в біореакторі для того, щоб культура перебувала у стаціонарній фазі роста.

Біореактор в залежності від об'ємів виробництва може бути у вигляді як поодинокої колони-пристрою, так і у вигляді декількох пристроїв, які найкраще розташувати паралельно одне до одного. В комплекті до такого реактора також відносяться контейнери із спеціальними рідинами для стерилізації та нейтралізації носія, контейнер для зберігання кінцевого продукту ферментації, контейнер для гідратації сухого носія, а також окремий контейнер для бактерій і їх вивантаження всередину реактора. В апараті можуть мути присутні певні клапани для управління рівня тиску та рівня вуглекислого газу всередині.

Для біосинтезу був обраний біореактор BIORUS 300L (рис. 3.10) [61].

Апарат досягає 450 л загального об'єму та має робочий обсяг в 300 л. Складається з подвійного шару стінки з нержавіючої сталі марки 316L та на поверхні має спеціальне оглядове вікно з функцією підсвічування. Додаткові порти призначені для під'єднання датчика температури, для пробовідбору та подачі додаткової рідини, а також запасний порт. Має дренажний клапан.

Кришка апарату також виконана із нержавіючої сталі марки 316L і має на поверхні 5 необхідних портів: для датчика піни, манометра, для введення мікроорганізмів, для мембранного перетворювача тиску, а також запасний порт.

Апарат містить нижній магнітний та верхній механічні приводи, оптимальна швидкість обертання валу знаходиться в межах 40-400 об/хв, але за додаткових вимог може працювати при 100-1000 об/хв [61].

Рис. 3.10. Промисловий ферментер BIORUS 300L

Мішалка Раштон збудована з нержавіючої сталі марки 316L у вигляді шести лопатей для перемішування маси. Мішалку можна налаштувати під конкретне культивування по висоті. Апарат також містить 3 відбійника [61].

Присутній теплообмінник для підігріву та охолодження води, всі необхідні трубопроводи та клапани для циркуляції. Стерилізація відбувається через стінку, що граничить із нагрівальним контуром. Пара редукційного клапана забезпечує стерилізацію інших деталей біореактора.

Фільтр може бути як автостерильним від фірми Millipore, так і керамічним стерилізуємим окремо. Газопостачання відбувається через єдину лінію за допомогою спеціального клапана контролю. Присутній манометр, зворотній та запірний клапани для регулювання, а також автоматичний витратомір. Всередині корпусу розташований конденсатор, який зумовлює постачання рідини для охолодження за допомогою спеціального регулюючого клапану. Апарат містить окремий клапан для пробовідбору, який стерилізується паром. Також до конструкції на контролері

під’єднані 3 насоси, що забезпечують передачу основних продуктів у ферментер. Їх швидкість становить 50 об/хв [61].

Апарат BIORUS 300L характеризується низкою окремих датчиків та пристроїв для контролю конкретних параметрів, необхідних для якісного протікання процесів ферментації.

Рівень температури підтримується за допомогою датчика Pt100, що розташований збоку апарату. Конструкція працює за рахунок активації контролером подачі пари або розчину для зниження температури та передачі їх у нагрівальний контур. Зверху апарату, в кришці, присутній датчик піни, що здатен подавати всередину піногасник. Датчик можна регулювати в залежності від умов культивації по висоті. Окрім цього, доступний процес відкачування надлишкової рідини з ємності.

Апарат також надає можливість контролювати такі параметри як рівень pH та pO2. Датчики розташовані в бічних портах ферментеру. Датчик pH представлений спеціальним стерильним гелевим електродом та здатен працювати в межах від 2 до 12 Ph, враховуючи похибку вимірювання +/- 0,05. Регуляція цього параметра відбувається за допомогою подачі через насос або клапан спеціальних розчинів кислот або лугів для вирівнювання середовища всередині посудини. pO2 датчик представлений амперометричним пристроєм, за допомогою якого активуються процеси подачі газу, тиску, процеси перемішування та інші функції, що забезпечують нормалізацію рівню розчиненого кисню в середовищі [61].

Інший параметр – швидкість обертання валу, оптимальна межа якого знаходиться в районі 40-400 об/хв. В іншому випадку може працювати в області від 10 до 1000 об/хв. Регулюється двигун такого валу також за допомогою контролеру через перетворення частоти індуктивного датчику.

Отже, біореактор BIORUS 300L підходить для періодичного культивування лактобактерій через можливість створення анаеробних умов синтезу. Процес контролюється механічним перемішуванням та має всі необхідні підводи для посівного матеріалу, поживного середовища, води та інших допоміжних речовин.

Ферментер з такою конструкцією забезпечую вільний доступ до всіх маніпуляцій та пропонує зручну роботу.

3.5. Сублімаційна сушарка KEMOLO FD300

Сублімаційні апарати вакуумної сушки є незамінними установками для використання у фармацевтичних виробництвах, у сфері харчової і хімічної промисловості, а також на біотехнологічних виробництвах.

Особливістю ліофільної сушарки є збереження біологічної активності препарату, а також вітамінів та інших необхідних складових. Через знаходження рідини в матеріалі в твердому стані після заморозки та подальшого нагрівання для переходу льоду в пару, не відбувається поглинання теплоти, яке здатне зруйнувати біологічну активність біомаси. Однак для того щоб цей процес відбувався необхідно створювати середовище з пониженою температурою. Утворена під час ліофілізації пара поглинається конденсатором. Таким чином, завдяки середовищу з температурою нижче нуля, зберігаються всі компоненти та поживні речовини [62]. На відміну від ліофілізації, звичайна контактна сушка є менш затратною, однак непридатною для отримання продуктів на основі живих не термофільних мікробних культур [63].

Процес сублімаційної сушки також здатен не впливати на колір, форму матеріалу, що в окремих ситуаціях є важливою рисою виготовлення препарату. Препарати такого типу здатні зберігатися протягом великої кількості часу. Вакуумна обробка матеріалу дозволяє уникнути псування через окиснення або вплив вологи. Зберігати готовий лікарський засіб (Лацидофіл) потрібно в герметичних упаковках на сухих та чистих місцях.

Ліофільно висушені бактерії здатні довго зберігати життєздатність та знаходяться в живій біологічно активній формі, проте чутливі до різних умов навколишнього середовища, таким як шлунковий і кишковий соки, температурні і осмотичні шоки [64, 65].

Для стадії ліофілізації була обрана сублімаційна сушарка KEMOLO FD300 (рис. 3.11). Це середня за розмірами сублімаційна сушарка, що розрахована на об'єм партії

до 300 кг. Всі аксесуари та допоміжні пристрої для роботи встановлені та йдуть разом із апаратом (табл. 3.2). Послідовність роботи з сушаркою полягає в тому, що спочатку матеріал проходить наступні операції підготовки: очищується, стабілізується та розподіляється на окремі частини для висушування. Далі за допомогою спеціального вакуум-насосу всередині апарату створюється вакуумний простір, а сам продукт поступово охолоджується до твердого стану. Після цього відбувається нагрівання попередньо замороженого продукту до певного рівня температури в залежності від природи матеріалу – відбувається сублімаційне обезводнення. Внаслідок утворена пара потрапляє всередину безперервного конденсатора замороженої пари, під кінець вода переміщується в пароконденсатор морозильної сушарки. Процес ліофілізації може протікати близько 20-30 годин, після чого препарат переміщуються в герметичні упаковки [66].

Рис. 3.11. Ліофілізатор KEMOLO FD300 [66]

Таблиця 3.2

Технічні параметри Ліофілізатору KEMOLO FD-300 [66]

Тип	*Тип терморадіаційний*
Комплектація	*Все в одному*
Вхідна потужність	*300 кг/доб*
Температура конденсатору	*-45°C*
Температура полки	*-35°C до +60°C*
Площина полки	*30.24 м²*
Відстань між полицями	*60 мм*
Обігрів / охолодження	*Силіконове масло*
Обігрів / охолодження	*За теплообмінником*
Кількість лотків	*66 штук*
Вакуумний насос	*Yoivac/Leybold*
Холодильний компресор	*Refcomp/Bitzer*
Холодоагент	*R404A*
Спосіб охолодження	*Вода/повітря*
Потрібна потужність	*42kW, 380V 50 Гц*
Спосіб розморожування	*Водний*
Система контроля	*Ручний + Авто*
Установка ($м^2$)	*30 $м^2$*
Габарити	*4.5*2.0*2.55м*
Розрахункова вага (кг)	*7000кг*

Саме за рахунок створеного вакууму виникає можливість заморозки препарату нижче нуля. Волога видаляється із матеріалу в процесі сублімації, тобто одразу із твердої фази лід перетворюється на пар, без перетворення на рідину. Ліофілізація забезпечує якісне видалення води із препарату та не пошкоджує структури вітамінів та інших необхідних елементів всередині матеріалу. Сушарка підбирається, виходячи із розрахунку за необхідним обсягом роботи та кількості партій. Виробництво продукту може займати добу.

Фірма KEMOLO пропонує два типа ліофілізаторів: ліофілізатор контактного та терморадіаційного різновиду.

Сутність сушарки контактного типу полягає в тому, що процеси нагрівання та заморожування проводяться без окремої морозильної камери та додаткового конвеєру або візків. Препарат знаходиться на лотках, що знаходяться на полицях. За

рахунок такого контакту відбувається поширення теплоти або заморожування. Такий апарат є легким для використання і установки, а процес розморожування відбувається після сублімаційного сушіння.

Терморадиційний ліофілізатор передбачає використання морозильної камери для поступового охолодження препарату. На відміну від контактного ліофілізатора матеріал розташований між верхніми та нижніми полицями, що забезпечує нагрівання за рахунок опромінення. Цей тип сушарки є складним для монтування та підключення, однак за його рахунок знижуються енергозатрати. До терморадіаційного ліофілізатору також входять у комплект візки та конвеєр.

Конструкція ліофілізатора KEMOLO FD300. Незважаючи на об'єми та потужності, ліофілізатори фірми KEMOLO мають у складі камери, системи для нагрівання та керування, теплообмінник, а також вакуумні та холодильні агрегати.

1. Система управління:

Брендом системи управління є Siemens. В морозильну сушарку та камеру встановлені датчики тиску для контролю перебігу процесів охолодження та сушіння, також встановлені датчики температури, які контролюють нагрівальну рідину. Всі електричні компоненти, включаючи частоту, напругу, вимикачі двигуна, захист від перенавантаження, тощо, контролюються загальною системою контролю.

2. Система опалення:

Для системи опалення можуть використовуватися такі рідини на вибір: вода, етанол або інші спирти, кремнієва олія, гліколь і т.д. Загалом може бути обраний електричний або паровий тип нагрівання.

Теплоносій забезпечує охолодження та нагрівання теплових пластин у апараті за рахунок певної рідини, яка нагрівається за допомогою електричного котла. Охолодження же проходить через допоміжний теплообмінник. Циркуляція носія відбувається завдяки спеціального відцентрового насоса.

3. Вакуумна система та вакуумний насос:

Система передбачає наявність зворотного та утримуючого насосів, вакуумних труб, сушильної камери та конденсатора із клапанами. Вакуумна система створює всі умови для швидкого та безпечного процесу сублімації. Чим більшою є морозильна

сушарка, тим більше передбачається потреба в резервних та утримуючих насосів для стабілізації установки, однак для малих і середніх сушарок це не є необхідним.

Для вакуумних систем використовуються такі бренди як: Edwards, Ulvac, Leybold та китайські бренди.

4. Холодильний компресор:

Холодильна система призначена для зниження температури конденсатора пари під час сушіння, а також для зниження температури полиць і безпосередньо заморожування препарату. Для холодильного компресора використовується холодоагенти R404A, R507, що є не шкідливими типами фреонів та екологічно чистими. Компресор має гвинтовий тип, що притаманний для великих апаратів або встановлюється в поршні малих морозильних сушарок.

Для холодильних компресорів використовуються бренди: Refcomp, Hanbell, Fusheng, Frascold, Bitzer та інші китайські бренди.

5. Посудина, полиці, піддони та конденсатор пари:

Основним матеріалом конденсатора пари являється нержавіюча сталь, а матеріал полок і лотків полиць є нержавіюча сталь або алюміній. Стандартна конфігурація нержавіючої сталі - SUS304, однак на вибір можна обрати нержавіючу сталь SUS316. Полки зварені, однак передбачається заміна на окремі полиці.

3.6. Технологія виробництва Лацидофілу

Технологія виробництва препарату Лацидофілу складається із поступових стадій, таких як отримання посівного матеріалу, основний процес культивування у ферментері, змішування культури та стабілізація культуральної рідини, заморожування із наступним ліофільним сушінням, а також капсулювання (рис. 3.12).

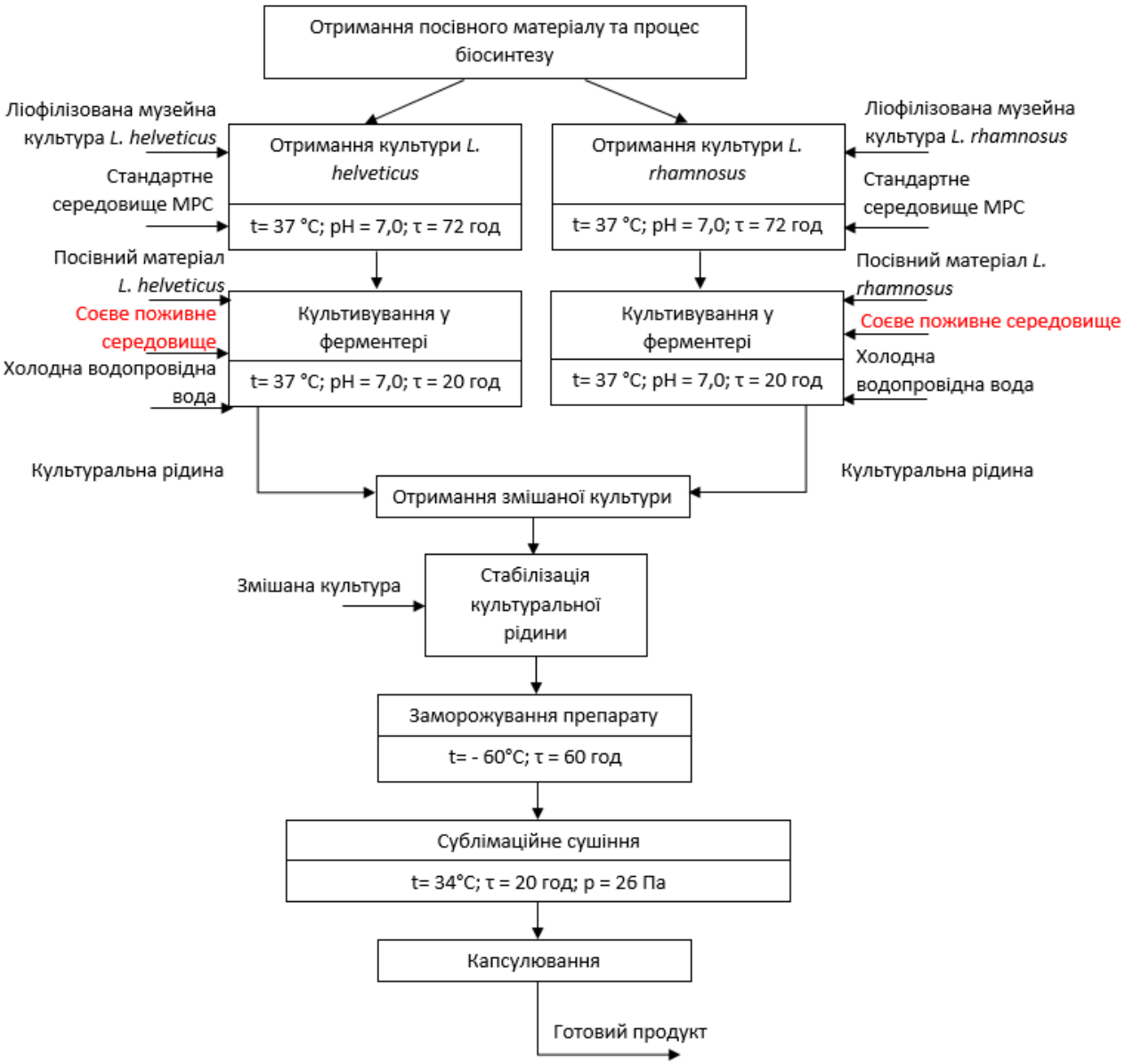

Рис. 3.12. Технологічна схема одержання готового продукту Лацидофілу

Підготовка посівного матеріалу. Культуру мікроорганізмів отримують в результаті двох послідовних пересівів на середовищі MRS, при чому бактерії *L. rhamnosus* та *L. helveticus* – окремо. Для культивування використовують готові ліофілізовані музейні штами, які вміщують 10^8–10^9 КУО/см3. В ампулу вносять фізіологічний розчин хлориду натрію, після чого матеріал переносять до поживного середовища. Культивування відбувається при 37°С протягом 72 год. Два послідовних процеса нарощування біомаси повинні проходити мікробіологічний контроль. Якщо перше покоління не має контамінуючої мікробіоти, то можна вважати, що воно придатне для отримання другого покоління мікроорганізмів. Далі проводиться

контроль після отримання другого покоління посівного матеріалу до загрузки культури у ферментер [6].

Культивування у ферментері. Стадію проводять при температурі 37°С протягом 20 год, pH середовища відповідає 7,0. Кожну годину протягом 10 хв приводять в рух пристрій для перемішування зі швидкістю 70 об/хв. Важливим є процес пробовідбору, який проводять кожні 2 години культивування з метою мікробіологічного контролю та аналізу вмісту живих клітин у біомасі. Коли концентрація бактерій відповідає 10^9 КУО/см3, то процес ферментації зупиняють.

Отримання змішаної культури та стабілізація культуральної рідини. Після процесу ферментації дві культуральні рідини, що містять культури *Lactobacillus rhamnosus* і *L. helveticus* змішують у пропорції 19:1 (95% *L. rhamnosus* та 5% *L. helveticus*), до них додають розчин желатози та захисне сахарозо-молочне середовище. Далі проводять мікробіологічний контроль на виявлення контамнуючої мікробіоти. Розчин желатози готують шляхом додавання до 100 г желатину 1 л дистильованої води, перші 3 години він відстоюється для набухання за кімнатної температури, після чого для більшого розчинення желатину його витримують при температурі 50 °С на водяній бані. Розчин стерилізується. Приготування сахарозо-молочного захисного середовища: знежирене молоко доводять до pH до 7,4-7,6, стерилізують при 120°С протягом 45 хв, після чого охолоджують до 40°С. Для досягнення 30% концентрації додають у розчин сахарозу та проводять стерилізацію [6].

Ліофілізація матеріалу. Спочатку проводять процес заморозки препарату. Отриману культуральну рідину переміщують на спеціальні полиці сушарки, де заморожують до температури -60° протягом 60 год із розрахунку до масштабів партії препарату. Після цього культуральну рідину починають нагрівати до температури 34°С протягом 20 год, при тиску в 26 Па.

Капсулювання – важлива стадія, під час якої суху масу подрібнюють і додають необхідні допоміжні речовини, і проходить процес капсулювання.

3.7. Висновки до розділу

Для здешевлення процесу виробництва препарату Лацидофіл перспективно обрати поживне середовище на основі соєвого борошна, яке в процесі культивації дає майже такий вихід лактобактерій, як і на багатокомпонентному MRS. Оптимальним pH було обрано 7,0, а доза посівного матеріалу – 5% для економії. Технологія виробництва препарату складається із декількох стадій: отримання посівного матеріалу, основний процес культивування у ферментері (обрано промисловий ферментер BIORUS 300L), змішування культури та стабілізація культуральної рідини, заморожування із наступним ліофільним сушінням (обрано ліофілізатора KEMOLO FD300**)**, а також капсулювання.

ВИСНОВКИ

1. Показано властивості двох штамів молочнокислих бактерій – біологічних агентів пробіотику 3-го покоління Лацидофілу.

2. Підібрано збалансоване поживне середовище для культивування мікроорганізмів *L. rhamnosus* та *L. helveticus* на основі середовища MRS із додаванням соєвого борошна замість бактеріологічного пептона у якості джерела азотного живлення.

3. Показано, що оптимальним pH для вирощування лактобактерій є 7,0; оптимальною дозою посівного матеріалу є 5% від об'єму поживного середовища.

4. Удосконалено технологічну схему отримання Лацидофілу, що дозволяє знизити вартість виробництва на 10%.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cho I. The human microbiome: at the interface of health and disease. / I. Cho, M. J. Blaser. // Nat. Rev. Gen. – 2012. – № 13. – P. 260–270.
2. Role of the gut microbiota in nutrition and health [Електронний ресурс] / A.Valdes, J. Walter, E. Segal, T. Spector // BMJ. – 2018. – Режим доступу до ресурсу: https://www.bmj.com/content/361/bmj.k2179.
3. Prebiotics: why definitions matter / [R. W. Hutkins, J. A. Krumbeck, L. B. Bindels et al.]. // Curr Opin Biotechnol. – 2016. – № 37. – P. 1–7.
4. Review: probiotics and their beneficial effects against various diseases. / [Iqbal M.Z., Qadir M.I., Hussain T. et al.]. // Pak J Pharm Sci. – 2014. – № 27(2). – P. 5-15.
5. Changyun Hu Type 1 diabetes and gut microbiota: friend or foe? / Ch. Hu, F. Susan Wong, L.Wen. // Pharmacol Res. – 2015. – №98. – P. 9–15.
6. Старовойтова С.О. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2012. – 318 с.
7. Милославський Д. К. Пробіотики: від Іллі Мечникова до сьогодення / Д. К. Милославський. // Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини. – 2020. – № 2. – С. 109–115.
8. Майданник В. Г. Пробиотики, пребиотики и симбиотики в педиатрической практике / Віталій Григорович Майданник. // Міжнародний журнал педіатрії, акушерства та гінекології. – 2017. – Т. 11, №4. – С. 54-69.
9. Пробиотики и пребиотики // «Ліки України». 2012. №7 (163) – С. 34–43.
10. Prebiotics: why definitions matter [Електронний ресурс] / [R. Hutkins, J. Krumbeck, L. Bindels et al.] // NCBI. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744122/#R16.
11. Пробиотики: монография / В. В.Мишин, Л. З. Гриценко, М. Н. Ананьева, Д. О. Шипов. – Донецк: Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького, 2012. – 221 с.

12. Шендеров Б. А. Функциональное питание и пробиотики: микроэкологические аспекты / Б. А. Шендеров, М. А. Манвелова. – [2-е изд., перераб.]. – М. : Агар, 1997. – 24 с.

13. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation [Електронний ресурс] // FAO/WHO. Food and Nutritional, Paper No. 85. – 2006. – Режим доступу до ресурсу: http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf.

14. Андреева И. В. Эффективность пробиотиков при инфекциях желудочно-кишечного тракта / И. В. Андреева. // Доктор.Ру. Гастроэнтерология. – 2015. – № 12 (113) – С. 34–41.

15. Применение пробиотиков в педиатрии: анализ лечебного и профилактического действия с позиции доказательной медицины / [Корниенко Е. А., Мазанкова Л. Н., Горелов А. В. та ін.]. // Лечащий врач. – 2015. – № 9. – С. 52–61.

16. Мазанкова Л. Н. пробиотики: характеристика препаратов и выбор в педиатрической практике / Л. Н. Мазанкова, Е. А. Лыкова. // Детские инфекции. – 2004. – №1. – С. 18–23.

17. Осипова И. Г. Экспериментально-клиническое изучение споровых пробиотиков: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук: 03.00.07 / Осипова И. Г; Гос. НИИ стандарт. и контр. мед. преп. им. Л.А.Тарасевича. – Москва, 2006. – 48 с.

18. Самчинская Л. М. Пробиотики в акушерстве и гинекологии / Л. М. Самчинская. – 2020. – № 4(54). – С. 110–117.

19. Старовойтова С. О. Сучасні аспекти технології іммобілізованих пробіотиків [Текст] / С.О. Старовойтова // Біотехнологія. – 2012. – Т.5, № 4. – С. 9-20.

20. Шевелева М. А. Современные представления о применении различных групп пробиотических средств при антибиотикотерапии / М. А. Шевелева, Г. В. Раменская. // Антибиотики и химиотерапия. – 2009. – № 54. – С. 61–68.

21. Хорошилова И. А. Про- и пребиотики в лечении инфекционных поражений кишечника / И. А. Хорошилова, В. М. Гранитов. // Медицинское обозрение. Наука и практика. – 2016. – №1 (5). – С. 20–24.

22. Актуальные вопросы совместного применения антибактериальных препаратов и пробиотиков / И. Б. Ершова, А. А. Мочалова, Т. Ф. Осипова, В. А. Резчиков. // Актуальна інфектологія. – 2015. – № 3 (8). – С. 25–30.

23. Лацидофил (Lacidofil). Состав и форма выпуска [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://compendium.com.ua/info/2406/latsidofil/.

24. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®), *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYNBIO(®) against pathogens / [M. M. Coman, M. C. Verdenelli, C. Cecchini et al.]. // Journal of Applied Microbiology. – 2014. – № 117. – P. 518–527.

25. Борцюх В. В. Бактеріоцини молочнокислих бактерій як природні консерванти харчових продуктів / В. В. Борцюх, М. О. Шугай. // Продовольчі ресурси. – 2016. – № 6. – С. 167–175.

26. Probiotics and Their Potential Preventive and Therapeutic Role for Cancer, High Serum Cholesterol, and Allergic and HIV Diseases [Електронний ресурс] / Y.Nazir, S. Hussain, A. Hamid, Y. Song. – 2018. – Режим доступу до ресурсу: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3428437/.

27. Агар MRS [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.dia-m.ru/upload/iblock/c75/1043%20%D0%90%D0%B3%D0%B0%D1%80%20MRS,%20%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F.pdf.

28. Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания / [Ильин В. К., Суворов А. Н., Кирюхина Н. В. та ін.]. // Вестник РАМН. – 2013. – № 2 – С. 56–62.

29. Питательная среда для выделения лактобактерий: пат. 2510416 РФ. №2012154888/10; заявл. 18.12.2012; опубл. 27.03.2014, Бюл. №9. – 7 с.

30. Лактобакагар [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://farmaktiv.com.ua/index.php/ru/pitatelnue-sredy/laktobakagar.

31. Лактобакагар «Питательная среда для выделения и культивирования лактобацилл сухая» [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://lactotest.com/product/laktobakagar/.

32. ГОСТ 10444.1-84. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. [Чинний від 1985-07-01]. Вид. офіц. СССР, 1985.

33. Среда Бликфельдта [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://farmaktiv.com.ua/index.php/ru/pitatelnue-sredy/blikfeldta.

34. ГОСТ Р 52687-2006. Продукты кисломолочные, обогащенные бифидобактериями бифидум. Технические условия. [Чинний від 2008-01-01]. Вид. офіц. Москва, 2007.

35. Домотенко Л. В. Бифидум-среда для выделения и культивирования бифидобактерий / Л. В. Домотенко, А. П. Шепелин. // Инфекция и иммунитет. – 2014. – С. 279–283.

36. Методические рекомендации "Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных" [Чинний від 2004-05-11]. Вид. офіц. Москва, 2004.

37. Bergey's manual of determinative bacteriology, 2nd ed. Volume 3: The Firmicutes. / P. De Vos, G. Garrity, D. Jones. ed. – Athens: Springer, 2009. – 1422 p.

38. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: Учебно-методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с.

39. Борцюх В. В. Бактеріоцини молочнокислих бактерій як природні консерванти харчових продуктів / В. В. Борцюх, М. О. Шугай. // Продовольчі ресурси. – 2016. – № 6. – С. 167–175.

40. *Lactobacillus rhamnosus* GG: Клинические аспекты применения с позиций доказательной медицины / [А. В. Горелов, Е. В. Каннер, М. Л. Максимов та ін.]. // Медицинский совет. – 2018. – № 17. – С. 66–73.

41. Effect of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenrichii ssp. shermanii* Combinations on Propensity for Split Defect in Swiss Cheese / S. R.White, J. R.

Broadbent, C. J. Oberg, D. J. McMahon. // Journal of Dairy Science. – 2003. – Vol. 86, № 3. – P. 719–727.

42. Фармацевтическая биотехнология. Пособие / [Д. В. Моисеев, Р. И. Лукашов, О. А. Веремчук та ін.]; под ред. Д.В. Моисеева. – Витебск: УО «Витебский государственный медицинский университет», 2013. – 292 с.

43. Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов/ И.М. Грачева, А.Ю. Кривова, / М: Изд.: «Элевар». – 2000. – 512 с.

44. Счетчик Культера MULTISIZER 4E [Електронний ресурс] // Диаэм. – 2014. – Режим доступу до ресурсу: https://www.dia-m.ru/upload/iblock/7bd/%D0%A1%D1%87%D0%B5%D1%82%D1%87%D0%B8%D0%BA%20%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%BA%20MS4e,%20Beckman%20Coulter,%20%D0%B1%D1%80%D0%BE%D1%88%D1%8E%D1%80%D0%B0,%20%D1%80%D1%83%D1%81.%D1%8F%D0%B7.,%2016%20%D1%81%D1%82%D1%80.%202017.pdf.

45. Изучение микроорганизмов, окисляющих железо, для возможного использования в биотехнологии очистки воды / К. Т.Нгун, Д. А. Рагузина, Е. В. Плешакова, М. В. Решетников. // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, №2. – С. 204–210.

46. Общая фармакопейная статья. Определение концентрации микробных клеток. ОФС.1.7.2.0008.15 [Електронний ресурс] // Министерство здравоохранения российской федерации. – 2015. – Режим доступу до ресурсу: http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/09/OFS.1.7.2.0008.15-Opredelenie-kontsentratsii-mikrobnyh-kletok.pdf.

47. Фотоэлектроколориметр цифровой АР-120 APEL [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://micromed.ua/shop/produkciya_dlya_laboratoriy/laboratornoe_oborudovanie/fotometri_spektrofotometri_analizatori_kuveti/tsifrovoj-fotoelektrokolorimetr-ap-120/.

48. Спектрофотометр V-1200 [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://spectrolab.com.ua/p19162100-spektrofotometr-1200.html.

49. Evidence for Proteolytic Activity of Lactobacilli Isolated from Kefir Grains / P.Kabadjova-Hristova, S. Bakalova, B. Gocheva, P. Moncheva. // Biotechnol. & Biotechnol. Eq. – 2006. – № 20(2). – P. 88–94.

50. Потенциометрическое титрование [Електронний ресурс]: методические указания к лабораторным работам «Определение pH и щелочности природной воды методом потенциометрического титрования», «Определение фосфатов методом потенциометрического титрования» / М-во образования и науки Рос. Федерации, Волгогр. гос. архит.-строит. ун-т. — Режим доступу до ресурсу: https://vgasu.ru/attachments/oi_kuznetchikov-02_000.pdf.

51. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – Чинний від 1994-01-01. – СССР: Комитет стандартизации и метрологии.

52. Беспоместных К. В. Изучение влияния состава питательной среды на изменение биохимических и морфологических свойств штаммов лактобацилл / К. В. Беспоместных. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1. – С. 77-78.

53. Зауэр Е. А. Современные анализаторы для определения азота методом Кьельдаля / Е. А. Зауэр, А. Б. Ершов. // Аналитика и контроль. – 2019. – Т. 23, № 2. – С. 168–192.

54. Филиппов М. Некоторые аспекты определения сырого протеина / М. Филиппов, Т. Тужикова. // Комбикорма. – 2012. – №3. – С. 85–90.

55. Красникова Л. В. Микробиология молока и молочных продуктов. Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие / Л. В. Красникова, П. И. Гунькова, В. В. Маркелова. – Санкт-Петербург: НИУ ИТМО, 2013. – 85 с.

56. Тимченко Л. Д. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капустная среда для культивирования лактобактерий / Л. Д. Тимченко, Н. И. Пенькова, Л. С. Катунина. // Вестник № 2. – 2010. – С. 51–55.

57. Изучение особенностей культивирования и подбор оптимальной питательной среды для *Lactobacillus* sp. / М. В. Анискина, Е. С. Волобуева, А. И. Петенко, С. А. Волкова. // КубГАУ. – 2015. – №114(10). – С. 1–11.

58. Промислова біотехнологія: навчальний посібник / М. Д.Мельничук, О. Л. Кляченко, В. В. Бородай, Ю. В. Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 252 с.

59. Квасников В. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования. / В.И. Квасников, О.А. Нестеренко − М.: «Наука», 1975. – 57 с.

60. Акулевич О. В. Кінетика росту молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* на живильних середовищах з різноманітними джерелами вуглецевого й азотного живлення / О. В. Акулевич, Л. Б. Орябінська, О. М. Дуган // Наукові вісті Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут". − 2013. − № 3. − С. 7−11.

61. Промышленный ферментер BIORUS 300L [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi-(laboratornyie-i-promyishlennyie)/promyishlennyij-fermenteryi-i-bioreaktoryi-(rossiya-,-biorus%C2%AE-)/promyishlennyij-fermenter-biorus-300l.html.

62. Гуйго Э. И. Сублимационная сушка пищевых продуктов / Э. И. Гуйго, Н. К. Журавская, Э. И. Каухчешвили. − М. : Пищевая промышленность, 1966. − 357 с.

63. Tan D. T. Microorganism preservation by convective air-drying – A review / D. T. Tan, P. E. Poh, S. K. Chin // Drying Technol. – 2018. – Vol. 36, № 7. – P. 764–779.

64. Научное обоснование создания новых лекарственных форм пробиотиков (обзор литературы и результаты собственных экспериментов) / П. А. Гордиенко, В. И. Чуешов, А. Д. Гордиенко, Е. В. Кудокоцева. // Медицина. Фармация. – 2015. – № 22 (219) – С. 121–127.

65. Петухова Е. В. Перспективность использования микрокапсулированных пробиотических культур в пищевой промышленности / Е. В. Петухова, А. Ю. Крыницкая // Вестн. Казан. технолог. ун-та. Промышлен. биотехнологии. – 2014. – № 22. – С. 257–260.

66. FD-300 Freeze Dryer | Freeze Dryer Machine [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://www.kemolo.com/?fproduct/l2/i714.