

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)**

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА  
ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

**Тема: «Технологія одержання пробіотичного препарату Симбітер»**

Виконавець: студентка 201Мз ФЕБІТ

Новікова

Є.Р.

Керівник: к.т.н., доцент кафедри біотехнології

Косоголова

Л.О.

Консультант розділу «Охорона праці»:

Павлиш В.

Д.

Консультант розділу

«Охорона навколишнього середовища»:

Фролов

В.Ф.

Нормоконтролер:  
В.

Дражнікова А.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

---

Кафедра біотехнології

---

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

---

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Барановський М.М.

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на виконання дипломної роботи**

**Новікової Єлизавети Русланівни**

1. Тема дипломної роботи: «Технологія одержання пробіотичного препарату Симбітер» затверджена наказом ректора від « 15 » вересня 2020 р. № 1657 /ст.
2. Термін виконання роботи: з 05 жовтня по 24 грудня 2020 р.
3. Вихідні дані роботи: пробіотики, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИКА СИМБІТЕР; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ, ДОДАТКИ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 81 с., 7 рис., 9 табл., 61 літературних джерела, 1 додаток.
  
6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання
1	Узгодження змісту дипломної роботи з керівником	05.10.20
2	Підбір літератури за темою дипломної роботи: «Технологія одержання пробіотичного препарату Симбітер»	06.10.20
3	Написання першого та другого розділів дипломної роботи	07.10.19 – 21.10.20
4	Систематизація отриманого матеріалу та написання третього розділу дипломної роботи	22.10.20 – 01.11.20
5	Оформлення результатів дослідження	02.11.20 – 05.11.20
6	Написання розділів «Охорона праці» та «Охорона навколишнього середовища»	06.11.20 – 27.11.20
7	Написання висновків та рекомендацій	28.11.20 – 30.11.20
8	Перевірка дипломної роботи керівником	01.12.20 – 07.12.20
9	Попередній захист дипломної роботи	10.12.20
10	Захист дипломної роботи	24.12.20

7. Консультація з окремих розділів:

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	Фролов В.Ф.		

8. Дата видачі завдання « 05 » жовтня 2020 р.

Керівник дипломної роботи \_\_\_\_\_ /Косоголова Л.О./  
(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ /Новікова Є.Р./  
(підпис випускника)

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Пояснювальна записка до дипломної роботи «Технологія одержання пробіотичного препарату Симбітер»: 81 с., 7 рис., 9 табл., 61 літературних джерела, 1 додаток.

**Об'єкт дослідження:** технологія виробництва пробіотику Симбітер.

**Предмет дослідження:** біологічні агенти, поживне середовище.

**Мета дипломної роботи:** удосконалення технології отримання пробіотику Симбітер.

**Методи дослідження:** аналітичні, біохімічні, мікробіологічні.

Відомо, що пробіотики – це непатогенні для людини мікроорганізми, які здатні відновити нормальну мікрофлору органів, а також згубно діють на патогенні та умовно-патогенні бактерії. Показано, що пробіотики поділяються на 6 поколінь. Пробіотики VI – покоління – це більш досконалі і складні полікомпонентні продукти, отримані із застосуванням нових технологій і містять кілька видів бактерій і речовини, що сприяють їх росту. Розроблена технологічна схема отримання пробіотичного препарату Симбітер. Проаналізовано та підібране оптимальне поживне середовище для пробіотику Симбітер, що дозволяє значно скоротити витрати на здійснення процесу, а також значно покращити процес ферментації.

**БІОТЕХНОЛОГІЯ, ПРОБІОТИКИ, БІФІДОБАКТЕРІЇ, ЛАКТОБАКТЕРІЇ, ПРОПОНОВОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ**

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	9
1.1. Історія відкриття пробіотиків.....	9
1.2. Загальна характеристика пробіотиків.....	11
1.3. Форми випуску пробіотичних препаратів.....	14
1.4. Загальна характеристика Симбітер.....	16
1.5. Характеристика продуцентів для пробіотиків.....	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	26
2.1. Характеристика об'єктів дослідження.....	26
2.1.1. Характеристика штаму <i>Bifidobacterium bifidum</i> В-7113.....	26
2.1.2. Характеристика штаму <i>Lactobacillus acidophilus</i> В-5863.....	28
2.1.3. Характеристика поживних середовищ.....	29
2.2. Методи дослідження.....	29
2.2.1. Визначення вмісту сухих речовин у поживному середовищі.....	29
2.2.2. Визначення титрованої кислотності у поживному середовищі титруванням з індикатором.....	31
2.2.3. Визначення активної кислотності.....	32
2.2.4. Визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів.....	33
2.2.5. Визначення коліформних бактерій.....	34
РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИКА СИМБІТЕР.....	36
3.1. Підбір оптимального складу поживного середовища для посівного матеріалу.....	36
3.1.1. Характеристика солодових сумішей.....	37
3.1.2. Характеристика ячмінно-солодового екстракту.....	43
3.2. Дослідження оптимального складу поживного середовища для процесу ферментації.....	45

3.3. Характеристика молочної сироватки.....	46
3.4. Технологія отримання Симбітер.....	48
3.5. Обґрунтування вибору ферментера.....	54
<b>РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....</b>	<b>56</b>
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори на виробництві пробіотичного препарату Симбітер.....	56
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при виробництві пробіотику Симбітер .....	57
4.3. Забезпечення пожежної і вибухової безпеки при виробництві пробіотичного препарату Симбітер.....	60
<b>РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....</b>	<b>65</b>
5.1. Виробничі фактори виробництва Симбітер, що впливають на навколишнє середовище.....	65
5.2. Методи очистки стічних вод при виробництві пробіотичного препарату Симбітер.....	66
5.3. Заходи щодо поліпшення впливу виробництва Симбітеру на організм людини.....	70
5.4. Висновки до розділу.....	71
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>73</b>
<b>СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>74</b>

**Актуальність.** За останні десятиліття при дослідженні етіопатогенетичних механізмів розвитку як інфекційних, так і багатьох неінфекційних захворювань, встановлено роль мікробного фактору, що вимагає застосування протимікробної терапії. Появі перших змін, що свідчать про порушення функцій відповідного характеру, передують парафізіологічні стани. У зв'язку з цим зросла тенденція до застосування пробіотичних препаратів [1].

Мультипробіотики – багатокомпонентні препарати, до яких на сьогодні належать Симбітер і Симбітер концентрований, наділені широким спектром пробіотичної активності. Мультикомпонентний склад цих препаратів (14 і більше штамів фізіологічно цінних бактерій) складається із родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Propionibacterium*, які знаходяться в мутуалістичних (взаємовигідних) зв'язках. Симбітер має концентрацію в одній дозі  $10^9$  живих клітин, а Симбітер концентрований містить в одній дозі  $10^{13}$  клітин [1].

Мультипробіотики мають високу антагоністичну активність по відношенню до широкого кола патогенної та умовно-патогенної мікрофлори. Вступають в асоціативний зв'язок з епітелієм кишечника (адгезивні властивості) і запобігають за рахунок цього його колонізації транзиторною мікрофлорою. Мультипробіотики резистентні до шлункового соку, травних ферментів, лізоциму, жовчних кислот, що дозволяє їм в активному стані проходити через усі відділи травного тракту і цілюще впливати на нього. Висока концентрація в мультипробіотиках бактеріальних екзополісахаридів і живих клітин-продуцентів збільшує його захисні властивості за рахунок підвищення активності адгезивних та імуномодуючих властивостей та селективної проліферації лактофлори в товстому кишківнику. Мікрофлора мультипробіотиків активно синтезує вітаміни В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, РР, В<sub>12</sub>, К і фолієву кислоту, також метаболізує білки, жири, вуглеводи, нуклеїнові кислоти за рахунок вмісту великого набору ферментів, а також розщеплює окремі харчові й бактеріальні алергени.

Мультипробіотики володіють цілою низкою позитивних відмінностей від препаратів сучасної біотерапії і мають особливо важливе фізіологічне значення для дитячого організму. Це дозволяє призначати їх дітям усіх вікових груп, починаючи з



новонароджених, без ризику негативних побічних ефектів. Крім того, багатоплановість пробіотичної активності не потребує одночасного призначення інших біотерапевтичних препаратів [12].

Тому актуальним є удосконалення існуючої технології виробництва пробіотиків з метою підвищення обсягів виробництва та покращення їх якості.

**Об'єкт дослідження:** технологія виробництва пробіотика Симбітер.

**Предмет дослідження:** біологічні агенти, поживне середовище.

**Мета роботи:** удосконалення технології отримання пробіотика Симбітер.

**Методи дослідження:** аналітичні, біохімічні, мікробіологічні.

**Завдання роботи** полягало у вирішенні таких задач:

1. Проаналізувати пробіотичні препарати та мікроорганізми, які входять до їхнього складу.
2. Проаналізувати та підібрати поживне середовище для культивування пробіотика Симбітер.
3. Підібрати ферментер для біосинтезу пробіотика Симбітер.
4. Розробити технологічну схему для пробіотика Симбітер.

# РОЗДІЛ 1

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1. Історія відкриття пробіотиків

Сто років тому, Ілля Мечников (російський вчений, лауреат Нобелівської премії і професор Пастерівського інституту в Парижі) висунув теорію, що бактерії молочної кислоти (БМК) сприяють поліпшенню здоров'я і довголіття. Він припустив, що «кишкова ауто-інтоксикація» і виникаючі внаслідок її речовини можуть бути продавлені за допомогою модифікації кишкових бактерій і заміни протеолітичних мікробів, таких як клостридіум, які продукують небезпечні (токсичні) речовини (включаючи феноли, індоли і аміак після перетравлення білків), на корисні мікроорганізми. Ним була розроблена дієта з додаванням молока, ферментованого бактерією, яку він назвав «Болгарською паличкою» [1].

У 1917 році, ще до відкриття сером Олександром Флемінгом пеніциліну, німецький професор Альфред Ніссле ізолював непатогенний штам кишкової палички з фекалій солдата Першої світової війни, який не викликав розвитку ентероколіту під час важкої епідемії шигеллеза. Захворювання шлунково – кишкового тракту і раніше часто лікувалися життєздатними непатогенними бактеріями для зміни або заміщення кишкових мікроорганізмів. Штам кишкової палички Ніссле 1917 – один з небагатьох прикладів не – БМК пробіотиків.

Біфідобактерія була вперше ізолювана Анрі Тіссє від новонародженого, який отримував грудне годування, і названа їм *Bacillus bifidus communis*. Тіссє стверджував, що біфідобактерії можуть замінити протеолітичні бактерії, що викликають діарею, і рекомендував введення біфідобактерій новонародженим, які страждають від цього синдрому [1,2].

Термін «пробіотики» вперше був введений в 1965 р Ліллі і Стіллуеллом; на противагу антибіотиків, пробіотики були описані як мікробні чинники, що стимулюють зростання інших мікроорганізмів. У 1989 р Рой Фуллер наголосив на

необхідності життєздатності пробіотиків і висунув ідею про їх позитивну дію для пацієнтів [1].

У нашій країні пробіотичні препарати почали з'являтися на початку 70-х років минулого століття. Це були одно-, двоштамові препарати, що містять ліофілізовану біомасу клітин *Coli*-бактерій, біфідобактерій і лактобацил. Їх і сьогодні часто застосовують для корекції дисбіозів: колібактерин, біфідумбактерин, лактобактерин, біфікол. На сьогоднішній день асортимент пробіотичних препаратів значно розширився, з'явилося багато препаратів закордонного виробництва.

Термін «пробіотики» був запропонований Річардом і Паркером в 1977 році для позначення мікроорганізмів і продуктів їхньої ферментації, що володіють антагоністичною активністю стосовно патогенної мікрофлори [2].

Історія створення мультипробіотиків бере свій початок з другої половини 80-х років ХХ століття. Після аварії на Чорнобильській АЕС відбувається різке збільшення кількості хворих, особливо дітей, з глибокими дисбіотичними порушеннями, що спричиняли розвиток довготривалих інфекцій та інших захворювань, які тяжко лікувались традиційними методами. Група українських фахівців в галузі мікробіології та медицини вирішила створити принципово нові вітчизняні засоби пробіотичної профілактики та терапії на основі цілющих мікроорганізмів. Колектив науковців під керівництвом Янковського Д.С. розробив принципово нову інноваційну біотехнологію багатокomпонентних пробіотиків [3].

На сьогоднішній день маємо значну кількість фарм препаратів та БАД, які містять представників нормальної мікрофлори людини. Дуже часто використовують різні штами лакто- та біфідобактерій, непатогенні штами кишкової палички і ентерококів. Окрім використання вже відомих штамів, фармацевтичні компанії займаються розробляють власні штами бактерій, які пізніше патентують і виробляють за ліцензіями.

## **1.2. Загальна характеристика пробіотиків**

Пробіотики – біологічні препарати, що містять штаминормальної мікрофлори кишечника. Пробіотики можуть міститися в різних продуктах харчування, лікарських засобах, дієтичних добавках [3]. У кишківнику знаходяться від 400 до 600 різних видів мікроорганізмів, найбільш важливими з них є лактобактерії, біфідобактерії, кишкова паличка, складуючі в нормі основу мікрофлори товстого кишечника. До цієї ж групи належать пропіоновокислі бактерії, бактеріоїди, ентерококи та ін. Видовий склад цих мікроорганізмів успадковується генетично і зміст їх у кишківнику здорової людини відносно постійний. Надлишок або нестача окремих представників нормальної мікрофлори називають дисбактеріозом.

На відміну від основної мікрофлори склад факультативної флори кишечника змінюється в залежності від дії тих чи інших факторів зовнішнього середовища. Факультативна флора представлена умовно-патогенними мікроорганізмами: стафілококами, стрептококами, клостридіями, протеями, дріжджоподібними грибами і т.д. Рівновага мікроекологічної системи кишечника залежить від співвідношення різних представників мікрофлори [4].

До мікроорганізмів, що використовуються для виробництва пробіотиків, відносять: *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L.lactis*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* та інші [5].

Кишкова мікрофлора відіграє важливу роль у підтримці здоров'я людини, виконуючи ряд функцій, що мають велике значення для життєдіяльності людини:

- регулює постійність мікробіоценозу і запобігає заселенню кишківника патогенними мікроорганізмами;
- сприяє процесам ферментативного перетравлення білків, ліпідів, високомолекулярних вуглеводів, нуклеїнових кислот, клітковини;
- бере участь в синтезі вітамінів групи В, К, аскорбінової кислоти, підвищуючи тим самим стійкість організму до несприятливих умов зовнішнього середовища;
- впливає на метаболізм жовчних кислот, холестерину;

– бере участь в детоксикації екзогенних і ендогенних субстратів, виступаючи в ролі біосорбенту і здійснюючи при цьому мікробну трансформацію токсичних речовин;

– синтезує речовини з антибактеріальною активністю;

– стимулює перистальтику кишківника, нормалізує евакуацію кишкового вмісту;

– бере участь в синтезі незамінних амінокислот, сприяє кращому засвоєнню солей кальцію і вітаміну D;

– підвищує імунну реакцію організму: стимулює лімфоїдний апарат, синтез імуноглобулінів, збільшує активність лізоциму, і сприяє зниженню проникнення судинних тканинних бар'єрів для токсичних продуктів патогенних мікроорганізмів;

– сприяє знищенню атипових клітин організму в результаті активації імунних процесів.

Зміна мікробіоценозу кишківника супроводжується різними порушеннями життєво важливих функцій організму, ускладненням перебігу хронічних захворювань. Для надання позитивного впливу пробіотиків на організм, перш за все необхідно, щоб наявні в них представники нормальної мікрофлори змогли прижитися і заселити кишківник. Щоб забезпечити успішну колонізацію бактерій у кишківнику необхідне поєднання цілого ряду сприятливих факторів: певний вид і штам мікроорганізмів і оптимальна дієта. Високоякісні харчові продукти, наприклад натуральний йогурт, містять мікроорганізми, які надають сприятливу дію, але є транзитними і не заселяють кишківник [5].

Еубіотики повинні мати здатність до виживання і життєдіяльності в умовах кишкового мікрооточення і зберігати життєздатність бактерій протягом тривалого терміну зберігання.

У сучасній літературі зустрічається кілька класифікацій препаратів пробіотиків. В основі більшості класифікацій лежить кількість вхідних видів мікроорганізмів, їх видова або родова приналежність, фізіологічні особливості мікроорганізмів. Визнана також класифікація, в якій препарати, які нормалізують

кишкову мікрофлору, поділяються на шість поколінь, у міру їх появи в медичній практиці:

Таблиця 1.1

Класифікація пробіотиків за поколіннями [5]

Покоління	Опис	Препарати
I	Пробіотики, які містять ліофілізат живих мікроорганізмів у вигляді монокультури і продукують молочну кислоту	Біфідумбактерин, Колібактерин, Лактобактерин, Ацилакт
II	Пробіотики, які являють собою комбінацію штамів з 2-4 компонентів живих молочнокислих бактерій і біфідумбактерій з іншими представниками природної мікрофлори, що забезпечує як їх замісну, так і конкурентну дію стосовно патогенів умовно-патогенної флори	Бфікол, Біфіформ, Лінекс, капсули йогургу
III	Пробіотики, які являють собою комбінацію непатогенних, нетипових для нормофлори спороутворювальних мікроорганізмів, або монокультур, наприклад; дріжджі <i>S.boulevardii</i> , що не продукують молочну кислоту, фармакологічна дія яких пов'язана з конкуруючим, антогоністичним впливом на агресивну мікрофлору кишковика	Б і о с п о р и н , Бактисубтил, Флонівін БС, Ентерол 250, А- бактерин
IV	Пробіотики, які містять комбінацію пробіотиків і пребіотиків	Вітабаланс 3000, Екстралакт, Біфілакт- екстра
V	Пробіотики на основі рекомбінантних генноінженерних штамів	Субалін

VI	Багатоштамові препарати нового покоління, створені в Україні	Симбітер та Симбітер-2
----	--	------------------------

За кількістю видів мікроорганізмів, препарати-пробіотики поділяються на монокомпонентні – (монопобіотики), монокомпонентні сорбованні побіотики, полікомпонентні (пробіотики), комбіновані побіотики (синбіотики). За видовою приналежністю компонентів – на біфідовмісні, лактовмісні, та інші.

В даний час розглядаються кілька основних показань для призначення еубіотиків (пробіотики): дисбактеріози різної етіології, в тому числі, що виникли після проведення антибактеріальної терапії; вагінальна грибкова інфекція; інфекція сечового тракту; профілактика атеросклерозу і новоутворень кишківника [6].

### **1.3. Форми випуску пробіотичних препаратів**

Залежно від способу консервування розрізняють рідкі і сухі бактеріальні препарати. Основне завдання технології виробництва бактеріальних препаратів на основі живих мікроорганізмів полягає в забезпеченні таких умов отримання та переробки мікробної маси, при яких в готовій продукції збереглося б максимальне число життєздатних клітин і не втрачалися б їх корисні властивості. Організація масового виробництва еубіотиків у вигляді порошків, таблеток, капсул, частково вирішує на сьогоднішній день одну з найважливіших завдань забезпечення людства пробіотичними препаратами [6].

Перевагою сухих препаратів слід вважати те, що бактерії знаходяться в стані анабіозу. Тому вони не так чутливі до перепадів температурного режиму, їх простіше зберігати. Однак, в разі використання сухих препаратів, не завжди можна говорити про отримання ефективного продукту харчування, так як більшість штамів бактерій при сушінні значно змінюють свою активність, перебуваючи в глибокому анабіозі, і відновлюють її тільки лише після 3-5 поділок при потраплянні в сприятливу для розмноження середовище. Їм потрібно близько 8-10 годин для переходу до активного фізіологічного стану, однак до цього часу велика їх частина вже може

природним чином елімінувати з кишечника. Для того щоб хоч якась частина бактерій закріпилася в кишківнику, їх концентрація в сухих препаратах повинна бути не менше, ніж 10<sup>10</sup>-10<sup>12</sup> живих бактерій в 1 грамі сухого порошку. Таку високу концентрацію живих бактерій отримати в умовах розпилювальної сушки або ліофілізації практично неможливо, так як від 10-25% популяцій бактерій гине [7].

Бактерії, які зберегли свою життєздатність різко знижують свою проліферативну активність, в результаті чого основна частина пробіотиків при їх призначенні проходить через кишечник людини і тварин транзитом, надаючи лише мінімальну лікувально-профілактичну дію і не проявляючи здатності до колонізації (заселення) даної екологічної ніші. Недоліком також слід вважати високу собівартість виробництва сухих концентратів внаслідок того, що обладнання для сушіння (ліофілізації), що розташоване в технологічному ланцюжку виробництва концентрату, настільки дороге, що далеко не кожне підприємство може дозволити собі його закупити [7].

Головна перевага рідких пробіотиків полягає в тому, що бактерії в них знаходяться в біологічно активній формі і здатні до колонізації вже через 2 години після потрапляння в організм [8]. Свій сприятливий вплив вони надають досить швидко після прийому препарату, що вигідно відрізняє рідкі пробіотики від подібних сухих препаратів. Окрім живих бактерій, рідкі пробіотики містять продукти їх життєдіяльності – дуже корисні для організму людини біологічно активні речовини: незамінні амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни, інтерфероностимулюючі та імуномодулюючі речовини. Зазначені метаболіти синтезуються пробіотичними мікроорганізмами не тільки в спеціально підібраному живильному середовищі, а й у інших харчових середовищах, а також в кишківнику людини [8].

Рідкі пробіотики завдяки своїм воістину унікальною лікувальною, профілактичною, загальнозміцнюючою діями охоплюють практично всі області медицини. Тривала апробація в провідних клініках в багатьох регіонах України показала високу ефективність їх застосування в гастроентерології, проктології, акушерстві та гінекології, педіатрії, хірургії та травматології, фтизіатрії,



дерматовенерології, онкології, в спортивній медицині, косметології та інших областях [9].

Рідкі пробіотики однаково корисні і безпечні і для дорослих, і для дітей. Рідкі пробіотики набагато дешевше сухих препаратів (за кількістю що містяться в них живих бактерій), що пояснюється налагодженими технологіями культивування і відсутністю стадії сушки.

#### 1.4. Загальна характеристика Симбітер

У пробіотичних препаратів «Симбітер» немає аналогів – адже вони є кращими мультипробіотиками для відновлення мікрофлори, усунення дисбактеріозів (дисбіозів), підвищення імунітету, поліпшення травлення, запобігання запору, загального зміцнення 16 організму, при профілактиці і комплексному лікуванні різних захворювань у новонароджених, дітей, вагітних, жінок, чоловіків різних вікових груп [8,9].



Рис. 1.1. Пробіотик Симбітер

Симбітер являє собою біомасу живих клітин симбіозу від 14 до 24 штамів бактерій – представників нормальної флори кишківника і сечовидільної системи.

Особливостями мультипробіотиків Симбітер є багатокомпонентний склад у формі стабільного симбіозу, широкий спектр пробіотичних властивостей, «жива» (неліофілізована) форма, сформована клітинами багато видного, стійкого симбіозу, основою якого є біфідобактерії, лактобактерії та пропіоновокислі бактерії.

В одній дозі (10 см<sup>3</sup>) міститься, КУО, не менш як: лактобактерій – 10<sup>9</sup>; біфідобактерій – 10<sup>8</sup>; пропіоновокислих бактерій – 3\*10<sup>7</sup>; оцтовокислих бактерій – 10<sup>5</sup>. Крім того, до складу препарату Симбітер входять такі допоміжні речовини: сахароза (ГОСТ 5833-75) – 7-10%, лимоннокислий натрій тризаміщений – 5%. Препарат випускають у вигляді концентрату у флаконах по 1 г [8].

### **1.5. Характеристика продуцентів для пробіотиків**

Біфідобактерії (*Bifidobacterium*) в основному використовуються в медицині як лікувально-профілактичний засіб. На основі вивчення особливостей біології біфідобактерій були розроблені принципи регулювання їх життєдіяльності в окремих екосистемах. Отримання нових нетрадиційних промислових штамів біфідобактерій і підбір оптимальних умов для їх життєдіяльності дозволили розробити ефективні лікувальні препарати [8].

Підбір і селекцію штамів мікроорганізмів для промислового виробництва здійснюють з кишківника здорових дітей і дорослих. При підборі культур для продуктів лікувально-профілактичного профілю велика увага приділяється в основному біфідобактеріям і лактобацилам як основним представникам нормальної мікрофлори кишківника. Широке застосування у виробництві ферментованих продуктів отримали біфідобактерії видів: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* і лактобацили видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, *Lactobacillus casei subsp. tolerans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* [8].

Велике значення при підборі штамів біфідобактерій має оптична характеристика молочної кислоти, яку вони продукують. Перевага віддається штамам, які утворюють L (+) форму, як найбільш фізіологічну для людського організму або суміш обох ізомерів (D і L). Відібрані штами біфідобактерій повинні бути стійкими до дії антибіотиків, бактеріофагів, NaCl, лужного середовища, жовчі і фенолу. З технологічної точки зору важливі швидкість і межі кислоутворення, органолептичні показники і протеолітична активність. Для виробництва сухих бактеріальних продуктів важливим є вивчення стійкості штамів біфідобактерій до підвищеної температури. Кардинальною ознакою штамів біфідобактерій є також антагоністична активність до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Важливим показником можливості проживання в організмі є визначення адгезивних властивостей штамів [9].

Систематика *Bifidobacterium bifidum*. *Bifidobacterium bifidum* № 1 відноситься до роду *Bifidobacterium*. Бактерії роду *Bifidobacterium* згідно «Визначника бактерій Берджи» (1997) віднесені до сімейства *Actinomycetaceae* 20 частини класу *Thallobacteria* відділу *Firmicutes* царства *Procaryotae*. До відділу *Firmicutes* входять організми з грампозитивною клітинною стінкою. За формою: коки, палички, розгалужені і нерозгалужені нитки. Розмножуються бінарним поділом. Деякі утворюють спори (ендо- або суперечки на гіфах або спорангіях). Більшість нерухомі, а рухливі мають джгутики. Аеробні, анаеробні і факультативно анаеробні організми. Діляться на 2 класу: *Firmibacteria* і *Thallobacteria*. Частина 20, класу *Thallobacteria*, об'єднує грампозитивні бактерії, що не утворюють ендоспори. Сюди входять бактерії трьох груп: корінеформні бактерії, пропіонові бактерії і актиноміцети. Актиноміцети об'єднані в порядок *Actinomycetales*. Ці бактерії утворюють розгалужені гіфи, деякі формують міцелій субстратний або повітряний, розмножуються конідіями, які утворюються на конідієносцях різної будови [8,9].

До родини *Actinomycetaceae* відносяться грампозитивні розгалужені форми, які не утворюють повітряного міцелію, що не є кислотостійкими, нерухомі форми. До складу сімейства входять анаеробні бактерії (рід *Bifidobacterium*) і факультативні анаероби (рід *Arachnia*, більшість видів роду *Actinomyces*). Поділ на роди здійснюється в залежності від хімічного складу клітинних стінок бактерій і

продуктів бродіння глюкози. Зазвичай живуть в ґрунті, руйнують багато органічних сполук, деякі види *Actinomyces* патогенні для людини і тварин. Відповідно до класифікації, представленої в визначнику Берджи світ прокаріотів розділений на 4 категорії. Рід *Bifidobacterium* віднесений до 2 категорії (грампозитивні мікроорганізми, що мають клітинну стінку) і 20 групи (грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми), без будь-якого об'єднання в сімейство [10].

Морфолого-культуральні ознаки *Bifidobacterium bifidum*: біфідобактерій роду *Bifidobacterium* (рис. 1.2) є неспороутворюючими, грампозитивні бактерії, палички, розміром  $0,5-1,3 \times 1,5-8$  мкм. Форма клітин варіює від прямих паличок до коків, з булавовидними потовщеннями на кінці, іноді розгалужені (В-, Т-форми), зернисті; в чистих культурах вони більш поліморфні.

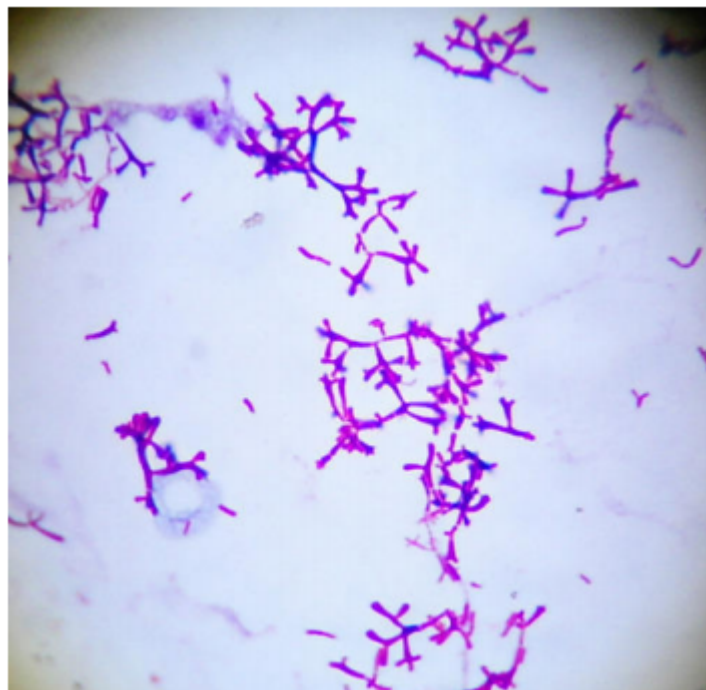


Рис. 1.2. *Bifidobacterium bifidum*

Розміщення клітин одинарне, парами, іноді ланцюжками або розетками. Іноді зустрічаються роздуті клітини коковидної форми. Анаероби. Деякі види можуть рости в атмосфері повітря, збагаченій 10 % CO<sub>2</sub>. Не ростуть при рН 8,5.

Слід зазначити, що довжина і форма клітин у різних культур одних і тих же видів біфідобактерій залежить, певною мірою, від складу середовища, присутності кисню, віку культури і способу інкубації [11]. Істотний вплив на форму клітин і ступінь викривленості надають присутність в середовищі вітамінів. Продовження клітин, їх витончення і фрагментування спостерігається при значному вмісті солі NaCl (до 6 %), при температурі, що набагато перевищує оптимальну, іноді – при високому вмісті етилового спирту. На форму клітин значний вплив може чинити іонізуюче випромінювання. Тенденція до утворення ланцюжків змінюється в залежності від фази зростання і рН середовища. При симбіотичному зростанні, під впливом високих концентрацій гліцину, D-амінокислот або антибіотиків, активних у відношенні клітинної стінки, можуть спостерігатися клітини неправильної форми.

На щільних поживних середовищах *Bifidobacterium bifidum* № 1 утворюють колонії, зазвичай невеликого розміру діаметром 2-5 мм, з рівним краєм, опуклі, плоскі, блискучі, непрозорі, білого або світло сірого кольору. Зростання на рідких поживних середовищах спостерігається у вигляді рівномірного помутніння або випадання гомогенного або, рідше, зернистого осаду [10,11].

При зростанні на середовищах загального призначення біфідобактерії не мають особливих запахів. Проте, вони в значній мірі обумовлюють запах продуктів бродіння, утворюючи різні леткі сполуки, такі як диацетил і його похідні, а також сірководень [12].

Характеристика пропіоновокислих бактерій (*Propionibacterium*): ці бактерії належать до сімейства *Propionibacteriaceae*, роду *Propionibacterium*, який включає дві основні групи мікроорганізмів, отриманні з різних природних середовищ. Види, які виділили з кисломолочних продуктів та сиру, належать до класичних пропіонобактерій. Вперше їх знайшли в маслинах, що заграли (ферментуючих).

До другої групи належать види, знайдені на людській шкірі або що зустрічаються в інших місцях, наприклад, кишківнику. Вони виділені також з вугрів, тому їх називають «групою акнес (вугрів)», або «шкірними пропіонобактеріями». Вугрями називають запалення сальних залоз шкіри. У першу групу включено 4 види: *P. freudenreichii*, *P. Jensenii*, *P. thoenii* і *P. acidipropionici*. До групи шкірних пропіонобактерій належать також 4 види: *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum* і *P.*

*lymphophilum*. Серед *P. acnes* і *P. avidum* розрізняють по два біовари, які позначають як перший і другий. Типовим видом роду є *Propionibacterium freidenreichii*, названий на ім'я швейцарського бактеріолога *Edouard'a Freidenreich'a*, який перший виділив цей вид. У минулому штами цього виду були диференційовані на 2 підвиди: *P.freidenreichii subsp. freidenreichii* і *P.freidenreichii subsp. schermanii*.

Перший підвид цих бактерій міг відновлювати нітрати і не ферментував лактозу, другий вид – навпаки. Тому в сироварінні використовували *P.freidenreichii subsp.schermanii*. Останнім часом такого розподілу немає, тому що підвиди визначають по генетичних, а не фенотипічних особливостях. Наприклад, вміст моль % гуаніна + цитозіна (Г+Ц) в молекулах ДНК різних видів мікроорганізмів. Межі такого вмісту для пропіоновокислих бактерій складають 53 – 68 моль % [12].

Морфологічні ознаки: бактерії пропіоновокислого бродіння є нерухомими грампозитивними паличками розміром 0,5-0,8 x 1-5 мкм. Вони не утворюють спор і капсул. Клітини можуть бути коковидними, рухомими, роздвоєними або розгалуженими, зустрічаються булавоподібні форми. Розташовуються одиночно, парами, короткими ланцюжками, у вигляді букв V або У або групами і у вигляді китайських ієрогліфів, але нитчасті форми відсутні [11,12].



Рис. 1.3. *Propionibacterium freidenreichii*

Класичні пропіонобактерії мають тенденцію до утворення і більш коротких і досить товстих форм, хоча всі штами можуть бути дуже варіабельними, особливо в ранніх культурах. Штами *P.acnes* утворюють тонкі палички в молодих культурах. У старішій культурі всі види мають тенденцію до утворення кокових форм. Значне число штамів всіх видів може продукувати позаклітинний слиз, не організований у форми чітких індивідуальних капсул. Склад і розташування амінокислот міжпептидних з'єднань (зв'язків) – пептидоглікане клітинної стінки – різне для окремих видів пропіонобактерій. Частіше зустрічаються поєднання: аланін-гліцилглутамін; аланін-глутамін-мезодіамінопімелінова кислота [12,13].

Культуральні властивості: пропіоновокислі бактерії є факультативними анаеробами, але варіабельними по аеротолерантності. Більшість культур росте тій тією чи іншою мірою на повітрі, хоча більшість штамів швидко росте в строго анаеробних умовах.

Харчові потреби обох груп пропіонобактерій схожі. Пантотенат кальцію потрібен для всіх штамів, ріст їх поліпшується тіаміном і нікотинамідом; сіль олеїнової кислоти (олеат) також є стимулятором, а деяким штамам потрібна рамінобензойна кислота. Потреби в амінокислотах комплексні для групи акнес, але деякі з класичних пропіонобактерій можуть рости з амонієм сульфатом як джерелом азоту [13].

Гарний ріст всіх пропіонобактерій може бути одержаний на трипсиноводріжджовому екстракт-глюкозному середовищі, що містить 0,05 % твина-80. Бактерії добре ростуть у бульйоні з пептоном, дріжджовим екстрактом і глюкозою в пробірках при вільному доступі повітря. Викликають помутніння бульйону і утворення часто забарвленого осаду. Більшість штамів росте в глюкозному бульйоні з 20 % жовчу і 6,5 % NaCl [13].

На щільному середовищі (кров'яному агарі) пропіоновокислі бактерії утворюють дрібні опуклі напівпрозорі блискучі колонії, які можуть бути білими, сірими, рожевими, червоними, жовтими або оранжевими. Оптимальний ріст спостерігається при температурі 30-37 °C і рН близько 7. Деякі штами ростуть при 25 і 45 °C. Класичні пропіоновокислі бактерії краще ростуть при 30-32 °C, а штами шкірних видів – при 36-37 °C. Максимальний ріст досягається через 48 год.

Характеристика лактобактерій (*Lactobacterium*): молочнокислі палички (лактобактерії) відносять до сімейства *Lactobacteriaceae*, роду *Lactobacterium*, що включає три підроди: *Thermobacterium* (термобактерії), *Streptobacterium* (стрептобактерії) і *Betabacterium* (бетабактерії). У зв'язку з тим, що молочнокислі палички спор не утворюють і тому не є бацилами, їх необхідно відносити до роду *Lactobacterium*.



Рис.1.4. *Lactobacterium*

До першої групи в підрід *Thermobacterium* віднесені облигатні гомоферментативні лактобактерії, до підроду *Streptobacterium* увійшла друга група, яка об'єднує факультативні гетероферментативні лактобактерії, третя група молочнокислих паличок представлена облигатними гетероферментативними лактобактеріями, віднесеними до підроду *Betabacterium*. Такий поділ є до певної міри умовним, оскільки багато нещодавно описаних видів не підходять під характеристики властивостей підродів за температурою зростання, морфологією та іншими особливостями [14].

До першої групи увійшли 15 видів гомоферментативних молочнокислих паличок, які ферментують вуглеводи виключно до молочної кислоти. У переважній більшості це термофіли, які розвиваються при 15 °С і не ростуть при 45 °С. Також віднесено 11 видів факультативних гетероферментативних лактобактерій, які можуть ферментувати вуглеводи до молочної кислоти або до молочної, оцтової і мурашиної кислот, етилового спирту та інших продуктів [14,15].



Представники другої групи є мезофілами, які не ростуть при 15 °С і розвиваються при 45°С. До другої групи віднесені 11 видів факультативних гетероферментативних лактобактерій, які можуть ферментувати вуглеводи до молочної кислоти або оцтової і мурашинної кислот. По гомології ДНК серед стрептобактерій розрізняють три основні комплекси видів або підвидів.

До третьої групи лактобактерій належить 18 видів облігатних гетероферментативних лактобактерій, які ферментують вуглеводи до молочної і оцтової кислот, етанолу і СО<sub>2</sub>. По відношенню до температури вони є мезофілами, які ростуть при 45 °С і не культивуються при 15 °С. До цієї групи належать всі облігатні гетероферментативні лактобактерії, віднесені до підроду *Betabacterium*.

Лактобактерії є ауксотрофами тому вони надзвичайно вимогливі до поживних середовищ. Вони адаптувалися до комплексних органічних субстратів і їм необхідно для розвитку не тільки вуглеводне джерело, але також і нуклеотиди, амінокислоти і вітаміни. Найчастіше для росту потрібен рибофлавін, є потреба у фолієвій кислоті, фосфаті піридоксала і р-амінобензойній кислоті, різноманітній для різних видів. Біотин і вітамін В<sub>12</sub> необхідні тільки для декількох видів [15].

Лактобактерії знаходяться на межі аеробного і анаеробного типів дихання. Вони володіють ефективним метаболізмом ферментації вуглеводів і амінокислот, який пов'язаний субстратним фосфорилуванням, тобто ферментативним приєднанням фосфату до органічної речовини.

Характеристика лактококів (*Lactococcus*): рід *Lactococcus* (від грец. *lactococcus* – молочний) включає п'ять видів типових лактококів *Lac.lactis*. Він об'єднує три підвиди: *Lac.lactis subspecies* (молочний лактокок); *Lac.lactis subsp. Ceremoris* (вершковий лактокок); *Lac.lactis subsp. hordnie*. В підвид *Lac.lactis subsp. lactis* ароматизуючий біологічний варіант, який називається *Lac.lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*. Окремі чотири види належать до роду *Lactococcus*: *Lac.garvieae*, *Lac.piscium*, *Lac.plantarum*, *Lac.raffinolactis*, а також підвид *Lac.lactis subsp. hordniae* перенесені в рід *Lactococcus* із інших родів [16].

Представники виду *Lac.lactis* (за винятком підвиду *Lac.lactis subsp. hordniae*) широко використовуються в молочній промисловості. Вони дуже схожі між собою,

26 продукують молочнокислі дегідрогенази, які ідентичні за вмістом моль % Г+Ц (гуаніна + цитозіна) в ДНК (38,6), гомологія ДНК/ДНК складає не менше 50%.

Лактококи – являють переважно гомоферментативні мікроорганізми, виняток становить *biovar diacetylactis*. Він утворює ароматичні речовини – діацетіл і ацетіон, здатний засвоювати солі лимонної кислоти (цитрати) і у зв'язку з цим належить до групи так званих цитроворусів. У цю групу також входять два основних представники роду *Leuconostoc* – *Leu.cremoris* і *Leu.dextranicum*.

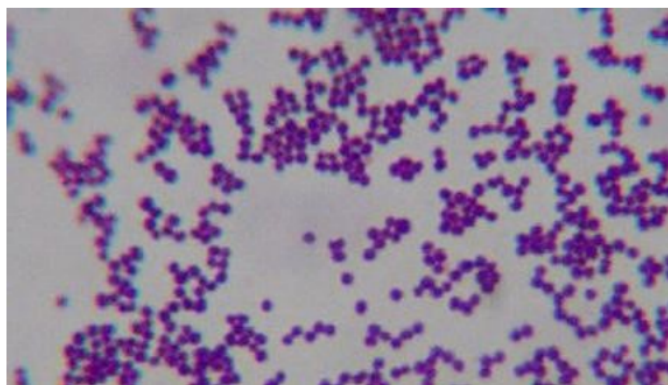


Рис.1.5. *Lactococcus*

Лактококи являють собою овальні клітини розміром 0,5-1,2x0,5-1,5 мкм, які розташовані у вигляді коротких ланцюжків або попарно; нерухомі, спор і капсул не утворюють. Лактококи є факультативними анаеробами, тобто ростуть не тільки в аеробних умовах, але і без доступу молекулярного кисню. Але в присутності кисню у них не змінюється тип дихання, тому що не проявляється аеробне дихання, а продовжується процес бродіння, тобто проходить анаеробне дегідроденірування. По відношенню до температури лактококи мезофідні, їх оптимальна температура росту 30 °С, розвиваються при 10 °С, але не при 45 °С. Більшість із штамів *Lac. lactis* мають широкий діапазон температури росту: від 8 до 41 °С. Лактококам, як і більшості молочнокислих бактерій, необхідні вітаміни: рибофлавін, тіамін, 27 пантотенова, нікотинова, фолієва кислоти, піридоксин (В6) та ін. Цим пояснюється позитивний вплив на ріст мікроорганізмів добавок у поживні середовища картопляного та кукурудзяного борошна [17].

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Характеристика об'єктів дослідження

Об'єктами дослідження в даній роботі були штами бактерій, на основі яких створено пробіотичний препарат Симбітер – *Lactococcus lactis ssp. lactis* ВКПМ В-4305, ВКПМ В-5387, *Lactococcus lactis ssp. diacetylactis* ВКПМ В-4303, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ВКПМ В-4304, ВКПМ В-4741, *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-5254, ВКПМ В-5863; *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ВКПМ В-3963, ВКПМ В-5810, *Lactobacillus helveticus* ІМВ В-7115; *Propionibacterium freudenreichii ssp. schermanii* ВКПМ В-4544, *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5800, *Bifidobacterium bifidum* ІМВ В-7113, ВКПМ В-5799; *Bifidobacterium longum* ВКПМ В-4557, ВКПМ В-4635; *Acetobacter aceti* ВКПМ В-5495 та поживні середовища: МРС-1, кукурудзяно-глюкозне, Лойцяньської, Біфідум [18].

##### 2.1.1. Характеристика штаму *Bifidobacterium bifidum* В-7113

Штам *Bifidobacterium bifidum* В 7113 (рис. 2.1) належить до роду *Bifidobacterium*, сімейства *Actinomycetaceae* та являє собою нерухомі грампозитивні поліморфні палички з біфуркацією на одному або на обох кінцях, довжиною 4-5 мкм, які розташовуються у вигляді скупчень або окремих клітин, або у вигляді римської цифри «V». По Граму закрашуються нерівномірно, грампозитивні, кислотонестійкі. Строгий анаероб, на поверхні щільних живильних середовищ за аеробних умов не росте. При рості на напіврідких середовищах – печінковому 28 середовищі Блаурока, гідролізатно-молочному (ГМ) та казеїно-дріжджовому (КД) – протягом першої доби викликає рівномірне скаламучення середовища, а протягом 2-3 доби утворює крихкий осад, лишаючи прозорою верхню частину середовища (зона аеробіозу) [17,18].

Окремі колонії біфідобактерій мають форму дрібних «гвіздків» або «крихт» білого кольору, що утворюють при струшуванні крихкувату масу. Хемоорганотроф. Активно зброджує вуглеводи з утворенням оцтової і молочної кислоти. Потребує вітаміни [19]. Ферментує лактозу з утворенням оцтової і молочної кислот, закисляє середовище росту до рН  $4,0 \pm 0,2$ . Арабінозу, ксилозу, маннозу, целобіозу, манніт, сорбіт, саліцин не ферментує. Зброджує молоко з утворенням до 16-18 годин стабільного згустку з відносно невисокою кислотністю (120-150) °С, яка майже не збільшується протягом 5-місячного терміну зберігання.



Рис. 2.1. *Bifidobacterium bifidum*

Штам *B.bifidum* не розріджує желатину. Визначення виконують шляхом посіву штаму у пробірці з печінковим середовищем Блаурока, яка містить 10% желатину. Посіви інкубують при  $(38 \pm 1)$  °С протягом 48 годин, після чого витримують при температурі  $(6 \pm 4)$  °С одну добу. У пробірках мають бути відсутніми ознаки розрідження желатину. Штам *B.bifidum* не утворює газу. Визначення проводять шляхом посіву штаму уколом у стовпчик щільного печінкового середовища Блаурока з 2 % агару. Після інкубації при  $(38 \pm 1)$  °С протягом 48-72 годин вздовж лінії уколу у середовищі мають бути відсутніми пухирці газу та тріщини.

Штам *B. bifidum* не продукує каталази. Визначення проводять шляхом внесення колоній біфідобактерій, виділених після зростання на печінковому середовищі Блаурока, до 1-2 краплин 3 %-вого перекису водню на предметному склі. Навколо колонії не повинні утворюватись пухирці газу. Біфідобактерії штаму *B. bifidum* повністю утилізують дев'ять вільних амінокислот в стерильному знежиреному молоці без ростових добавок: гліцин, аланін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, гістидин, аргінін [20].

### 2.1.2. Характеристика штаму *Lactobacillus acidophilus* В-5863

Штам *Lactobacillus acidophilus* належить до виду роду *Lactobacillus*, сімейству *Lactobacillaceae* та являє собою палички довжиною від 0,7-1,1 до 3,0-8,0 мкм, розміщені поодинокі або ланцюгами. Нерухомі, не утворюють спор, не мають жгутиків, грампозитивні. Факультативні анаероби, ростуть в атмосфері вуглекислого газу, азоту, а також в присутності кисню. На рідкому середовищі МРС-1 виростають у вигляді рівномірної муті і гомогенного білого осаду на дні пробірки. У напіврідкому поживному середовищі МРС-2 утворюють ізольовані колонії у вигляді тяжів [20,21].

На щільному поживному середовищі МРС-4 утворюють випуклі, непрозорі, білі колонії з цільними краями, не пігментовані. Хемоорганотрофи; потребують багатих складних поживних середовищ. Метаболізм 30 бродильного типу, цукропластичний; майже половина вуглецю кінцевих продуктів бродіння випадає на лактат. Нітрати не відновлюють; желатин не розріджують; каталазонегативні; цитохромів не містять [20]. Штам *Lactobacillus acidophilus* ферментує глюкозу з утворенням кислоти без газу; розкладає целобіозу, галактозу, цукрозу; слабо ферментує сорбіт, мальтозу, саліцин, манніт. Рамнозу не ферментує [20].

### 2.1.3. Характеристика поживних середовищ

Поживне середовище МРС-1 використовується для одержання культури лактобактерій. До складу середовища МРС-1 входять г/дм<sup>3</sup>: MnSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O – 0,05; цистеїн – 0,1; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O – 0,2; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O – 2,0; амоній лимонно-кислий – 2,0; CH<sub>3</sub>COONa\*3H<sub>2</sub>O – 5,0; пептон сухий ферментативний – 10,0; глюкоза – 20,0; рідкі компоненти, (см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>): печінковий екстракт – 100,0; дріжджовий автолізат (вміст амінного азоту 0,15 %) – 50,0; гідролізат знежиреного молока – 330,0; твін-80 – 1,0; вода очищена – до 1,0 дм<sup>3</sup>; рН (6,4±0,2).

Поживне середовище Біфідум використовується для одержання культури біфідобактерій. До складу середовища входять г/дм<sup>3</sup>: панкреатичний гідролізат казеїну – 30,0; екстракт пекарських дріжджів – 5,0; глюкоза – 2,5; лактоза – 7,5; цистеїн – 0,5; NaCl – 0,5; MgSC>4 – 2,5; аскорбінова кислота – 0,5; ацетат натрію – 0,3; лимоннокислий амоній – 0,3; агар – 0,75; вода – до 1,0 дм<sup>3</sup>; рН – 6,8-7,3.

Поживне середовище Лойцянської використовується для одержання оцтовокислих бактерій. До складу середовища входять г/дм<sup>3</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O – 0,5; вода – до 1,0 дм<sup>3</sup>. Джерело вуглецю – етиловий спирт – 0,2-0,5 % (за об'ємом) [21].

Кукурудзяно-глюкозне поживне середовище використовується для одержання пропіоновокислих бактері. До складу середовища входять г/дм<sup>3</sup>: глюкоза — 20; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,0; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; СоСІ<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O – 0,01; рідкі компоненти, см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>: кукурудзяний екстракт – 15; вода – до 1,0 дм<sup>3</sup>; рН 6,8-7,0;

## 2.2. Методи досліджень

### 2.2.1. Визначення вмісту сухих речовин у поживному середовищі

Вмістом (концентрацією) сухих речовин називають загальну кількість усіх компонентів (крім води), які містяться в 100 г (або в 100 мл) досліджуваного продукту, виражену в масових відсотках або в г/100 мл відповідно. Розрізняють

поняття істинних і видимих сухих речовин (або істинного і видимого вмісту сухих речовин). Істинними називають сухі речовини, вміст яких визначають безпосередньо висушуванням. Вміст видимих сухих речовин знаходять непрямым шляхом за показником, який змінює своє значення пропорційно до зміни концентрації сухих речовин, а саме – за відносною густиною розчину або показником заломлення. Вміст сухих речовин у розчині визначають за допомогою аерометра, пікнометра або рефрактометра [21,22].

Рефрактометричний метод ґрунтується на визначенні концентрації речовин за показником заломлення – відношенням синуса кута падіння  $\alpha$ , до синуса кута заломлення  $\beta$  (відношенням швидкості поширення світла в одному середовищі  $v_1$  до швидкості поширення світла у другому  $v_2$ ):

$$n = \sin\alpha/\sin\beta = v_1/v_2$$

Показник заломлення визначають за допомогою рефрактометра, принцип дії якого ґрунтується на вимірюванні граничного кута заломлення. Якщо кут падіння променя дорівнює  $90^\circ$ , то промінь світла, який заломлюється в іншу фазу, утворює граничний кут заломлення  $\varphi$ :

$$n_1 = n_2 \sin \varphi$$

Якщо відомий показник заломлення ( $n_2$ ) для одного середовища (призми), то для іншого (аналізований розчин)  $n_1$  визначають за граничним кутом заломлення, встановленим за лінією розділу світла та тіні, що спостерігається у рефрактометрі. Шкала рефрактометра може бути від градуйована за значеннями вмісту СР у розчині або його показника заломлення. Переваги методу – швидкість і простота вимірювань, достатня точність (0,01%), мала витрата досліджуваної речовини, можливість автоматизації контролю виробництва [21].

Рефрактометричний метод застосовують для аналізу водних, спиртових, ефірних та інших розчинів з масовою концентрацією розчиненої речовини вищою, ніж 1%. Прилади та реактиви: рефрактометр, термометр, скляна паличка, фільтрувальний папір, досліджуваний розчин [21].

Послідовність виконання роботи: на суху поверхню вимірювальної призми рефрактометра, не торкаючись поверхні призми, скляною паличкою наносять одну-дві краплини профільтрованого досліджуваного розчину та плавно опускають

верхню камеру. Переміщенням окуляра в поле зору приладу виводять межу світлотіні та встановлюють чіткість її зображенн. Окуляр переміщують до суміщення візирної лінії (центральної точки поля зору) з межею світлотіні. За правою шкалою рефрактометра, градуйованою за розчинами сахарози, знаходять вміст сухих речовин (у мас. %) у розчині. Вимірювання виконують при температурі 20 °С. Як остаточний результат приймають середнє арифметичне двох паралельних визначень.

### 2.2.2. Визначення титрованої кислотності у поживному середовищі титруванням з індикатором

Титрованою кислотністю називають загальний вміст вільних кислот та їх кислих солей у сировині, напівпродуктах і готовій продукції, який визначають титруванням розчином лугу. Метод заснований на нейтралізації кислот і кислих солей, які містяться у поживному середовищі, розчином гідроксиду натрію. Титрування проводять із застосуванням індикатора фенолфталеїну для встановлення точки еквівалентності. Кислотність виражають в см<sup>3</sup> розчину гідроксиду натрію концентрацією 1 моль/ дм<sup>3</sup> на 100 см<sup>3</sup> поживного середовища [22].

Прилади та реактиви: конічні колби місткістю 100 см<sup>3</sup>, піпетки місткістю 10 і 20 см<sup>3</sup>, бюретка місткістю 20 см<sup>3</sup>, мірний циліндр місткістю 50 см<sup>3</sup>, розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, спиртовий розчин фенолфталеїну масовою концентрацією 10 г/дм<sup>3</sup>, скляна паличка, біла порцелянова пластина. Послідовність виконання роботи: 0,5 см<sup>3</sup> поживного середовища відбирають піпеткою, переливають у колбу місткістю 100 см<sup>3</sup>. У мірному циліндрі відміряють 50 мл дистильованої води і переносять у колбу і додають 3-4 краплі спиртового розчину фенолфталеїну масовою концентрацією 10 г/дм<sup>3</sup>. Вміст колби титрують з бюретки розчином гідроксиду натрію до появи слабо рожевого забарвлення, яке не зникає впродовж 30 секунд. Якщо колір зникає раніше, титрування продовжують. Розрахунок кислотності ведуть за формулою:

$$X = (V \times K \times 10) / A,$$



де  $V$  – об'єм розчину гідроксиду натрію концентрацією  $0,1$  моль/дм<sup>3</sup>, витрачений на титрування, см<sup>3</sup>;  $K$  – поправочний коефіцієнт розчину гідроксиду натрію;  $A$  – об'єм поживного середовища, см<sup>3</sup>.

Кінцевим результатом дослідження вважається середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, допустимі розбіжності між якими по абсолютній величині не повинні перевищувати  $0,05$  см<sup>3</sup> в одній лабораторії. Допустимі розбіжності по абсолютній величині у різних лабораторіях не повинні перевищувати  $0,30$  см<sup>3</sup>. Обрахунки проводять до  $0,01$  см<sup>3</sup> з наступним округленням до  $0,1$  см<sup>3</sup>.

### 2.2.3. Визначення активної кислотності

Активною кислотністю називають концентрацію вільних водневих іонів у досліджуваному розчині. Тобто, це та частина кислих речовин, що міститься в розчині у вигляді іонів  $H^+$ . Активну кислотність інакше називають водневим показником і позначають рН, тобто  $pH = -\lg[H^+]$ . Прилади та реактиви: рН-метр; термометр; хімічна склянка на  $50$  мл; досліджуваний розчин. Послідовність виконання роботи: прилад вмикають у мережу і прогрівають  $25-30$  хв до початку роботи (увімкнено перемикач «t,0»). У хімічну склянку наливають досліджуваний розчин. У склянку розміщають термометр і скляний електрод та електрод порівняння так, щоб глибина їх занурення в розчин складала  $20-40$  мм. Регулятором компенсатора температури встановлюють температуру аналізованого розчину. Перемикач «Вид робіт» встановлюють на поділку «рН», а перемикач «Межі вимірювань» – на поділку «1-14». Покази рН-метра знімають за нижньою шкалою. Для уточнення значення рН розчину перемикач «Межі вимірювань» встановлюють на поділку того під діапазону, в межах якого воно знаходиться [23].

Активну кислотність розчину встановлюють з точністю до  $0,05$  одиниць рН. Покази рН-метра знімають через  $0,5-1$  хв після ввімкнення відповідного  $35$  перемикача, коли вони набудуть постійного значення. Температура визначення повинна знаходитися в межах  $20-30^{\circ}C$ . За остаточний результат приймають середнє арифметичне двох вимірювань [24].

#### 2.2.4. Визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативноанаеробних мікроорганізмів

Суть методу полягає в кількісному підсумку числа колоній мікроорганізмів, що зростали на щільному поживному середовищі при температурі  $(30 \pm 1)$  °C на протязі 72 годин. Для посіву потрібно використовувати такі розведення продукту, щоб на чашках Петрі виросло приблизно від 30 до 300 колоній.

В залежності від допустимого ступеня мікробного обсіменіння роблять не менше 2 розведень. По 1 см<sup>3</sup> з кожного розведення переносять на дно двох стерильних чашок Петрі (два паралельних визначення). У чашки Петрі з посівним матеріалом доливають по (10-15) см<sup>3</sup> попередньо розтопленого і охолодженого до температури (40-45) °C поживного середовища і обережними обертами перемішують при закритій кришці, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всьому поживному середовищу. Далі чашки Петрі з посівним матеріалом потрібно залишити на горизонтальній поверхні до повного застигання поживного середовища. Після застигання середовища чашки інкубують у термостаті догори дном за температури 30 °C 72 години (допускається попередній підрахунок через 48 годин з наступним остаточним підрахунком ще через 24 години). Після зазначеного для інкубації часу проводять облік колоній мікроорганізмів, які виросли на чашках. Підраховують ті чашки розведення, де кількість колоній знаходиться в межах від 30 до 300.

За допомогою лупи зі збільшенням у 4-10 разів або приладу для підрахунку колоній потрібно підрахувати кількість колоній, які виросли на кожній чашці Петрі. В деяких випадках при великому числі колоній дно чашки поділяють на (4-6) однакових секторів, підраховуючи число колоній на (2-3) секторах (але не менше ніж на 1/3 поверхні чашки), знаходимо середнє арифметичне число колоній, яке множимо на загальну кількість секторів усієї чашки. Ось так , знаходимо загальну кількість колоній, які виросли на одній чашці Петрі.

Далі кількість колоній , які виросли на кожній чашці Петрі, потрібно перевести на 1 г або см<sup>3</sup> продукту з урахуванням розведення. Кінцевим результатом

буде середнє арифметичне від результатів підрахунків колоній на окремих чашках одного розведення. Результат аналізу виражають у вигляді числа КУО/г (або см<sup>3</sup>) з вказівкою відповідності або невідповідності продукту мікробіологічному нормативу на цей показник [25].

#### 2.2.5. Визначення коліформних бактерій

Коліформні бактерії – грамнегативні палички, що не утворюють спор, розкладають лактозу до кислоти та газу за температури 37 °С протягом (24-48) годин. Посів проводиться у середовище Кесслер з лактозою та поплавками. Посіви інкубують за температури (37±1) °С протягом (24-48) год (з обов'язковим переглядом посівів через 24 години інкубації). При відсутності газоутворення та помутніння в пробірках з середовищем роблять висновок про відсутність коліформних бактерій в засіяному об'ємі та відповідність продукту нормативу.

При помутнінні та виділенні газу в пробірках роблять посів на поживне середовище Ендо так, щоб отримати ріст ізольованих колоній. Чашки з Ендо інкубують при 37 °С протягом (18-24) годин. Висів на Ендо потрібний для остаточного обліку коліформних бактерій та визначення мікроорганізмів, підозрілих на шигели чи сальмонели. Облік посівів на середовище Ендо:

– Ріст колоній мікроорганізмів відсутній – видається негативна відповідь: Коліформні бактерії в засіяному об'ємі відсутні.

– При наявності росту темно-червоних з металевим блиском чи без нього червоних або рожево-червоних колоній за характером росту типових для коліформних бактерій (округлі, плоскі чи злегка випуклі або з піднятим центром, блискучі, легко знімаються з агару) з ознаками редукції (червоний відбиток під колонією та червоною зоною навколо колонії) на всі види колоній ставлять оксидазний тест та роблять мікроскопію. При виявленні грамнегативних оксидазанегативних паличок видається позитивний результат – в засіяному об'ємі продукції виявлені коліформні бактерії. При виявленні безбарвних прозорих колоній на чашках з середовищем Ендо підозрілих на патогенні бактерії ці чашки повинні передаватися в лабораторії санітарно-епідеміологічних станцій для подальшої

ідентифікації. На знежирене предметне скельце наносять 1 краплю стерильної дистильованої (водопровідної) води. В ній розтирають матеріал, який здобутий петлею з характерної колонії на щільному середовищі. Потім вносять краплю реактиву. Суміш розподіляють по ділянці 1 см<sup>2</sup>, підсушують за кімнатної температури і фіксують одноразовим проведенням предметного скельця через полум'я пальника.

На одному скельці можна готувати 6-8 мазків, відокремлюючи їх один від одного лініями, що проведені з лицьової сторони скельця. Препарат споліскують водою та ретельно просушують фільтрувальним папером. Після просушування на препарат наносять з надлишком реактив так, щоб рідина покрила всю поверхню скельця. Тривалість забарвлення (0,5-1) хвилини [26].

Як тільки відбулося забарвлення препарат швидко споліскують проточною водою, направляючи струмінь під кутом на скельце, яке розташоване вертикально. Препарату потрібно дати висохнути на повітрі або промокнути фільтрувальним папером і дивляться під мікроскопом з імерсійною системою. Мікроби, які забарвлюються за Грамом (грам позитивні) мають темно – фіолетовий колір. Мікроби, які не забарвлюються за Грамом (грамнегативні), мають червоний колір. По 2-3 ізольованих колоній кожного типу, які вирости на середовищі Ендо, знімають петлею або скляною паличкою і наносять штрихом на фільтрувальний папір, який змочений реактивом (2-3 каплі кожного реактиву). В місці нанесення бактеріальної маси папір не змінює кольору, якщо оксидазний тест негативний, і синіє протягом однієї хвилини, якщо бактерії мають активну оксидазу.

### **РОЗДІЛ 3**

#### **ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИКА СИМБІТЕР**

### 3.1. Підбір оптимального складу поживного середовища для посівного матеріалу

Аналіз технології виробництва бактеріальних препаратів показав, що важливим і перспективним напрямком є вдосконалення початкових – базових етапів виробництва, а саме створення максимально продуктивних умов накопичення біомаси – оптимізація складу поживного середовища. Для культивування пропіоновокислих бактерій використовують поживне середовище, до складу якого входять компоненти: глюкоза, сульфат амонію, монофосфат калію, хлорид кобальту, кукурудзяний екстракт, вода (табл. 3.1) .

Ячмінно-солодовий екстракт містить більше вітамінів групи В , низкомолекулярних цукрів , незамінних амінокислот, а це значно покращує процес ферментації [27].

Таблиця 3.1

Склад поживних середовищ для вирощування пропіоновокислих бактерій

Кукурудзяно-глюкозне поживне середовище	Ячмінно-солодове поживне середовище
Глюкоза – 20 г/дм <sup>3</sup>	Глюкоза – 20 г/дм <sup>3</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 3,0 г/дм <sup>3</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 3,0 г/дм <sup>3</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,0 г/дм <sup>3</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,0 г/дм <sup>3</sup>
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O – 0,1 г/дм <sup>3</sup>	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O – 0,1 г/дм <sup>3</sup>
Кукурудзяний екстракт – 15 г/дм <sup>3</sup>	<b>Ячмінно-солодовий екстракт</b>
H <sub>2</sub> O – до 1,0 см <sup>3</sup> /дм <sup>3</sup>	H <sub>2</sub> O – до 1,0 см <sup>3</sup> /дм <sup>3</sup>

#### 3.1.1. Характеристика солодових сумішей

Основну частину органічних речовин зерна становлять вуглеводи і білки. Крім них, у зерні є жири, органічні кислоти, вітаміни. Вуглеводи є одним з важливих компонентів ендосперма зерна. За хімічним складом вуглеводи поділяються на прості сахари (глюкоза, фруктоза, ксилоза, сахароза, мальтоза, рафіноза та ін.) і полісахариди (крохмаль, інουλін, не крохмальні полісахариди та ін.).

Крохмаль, будучи запасною речовиною зерна, нагромаджується в ньому у великих кількостях і міститься в ендоспермі зерна. В інших частинах зерна його звичайно немає. Винятком є кукурудза, в якій найбільше крохмалю міститься в зародку. Вміст крохмалю в зерні однієї й тієї самої культури коливається залежно від сорту, району, умов зростання і ступеня стиглості насіння. Наприклад, у разі випадання великої кількості опадів вміст крохмалю в зерні вищий. У вирівняному зерні крохмалю більше, ніж у плоскому [28].

Таблиця 3.2

Хімічний склад зернових культур (у %/суху речовину)

Злаки	Крохмаль	Сахари	Клітковина	Геміцелюлоза	Гумі-речовина	Білки
Пшениця	58-74	2,0-4,0	1,9-2,5	7,3-8,5	0,64	8,0-24,0
Жито	50-66	4,0-7,0	1,9-2,8	8,0-12,0	4,0-5,7	11,0-14,0
Кукурудза	60-72	1,5-5,0	1,6-1,9	4,6	0,2-0,5	10,0-12,0
Ячмінь	54-66	3,0-7,0	4,3-6,0	5,0-7,6	3,3-3,8	9,0-16,0
Овес	40-50	–	5,9-12,6	11,0-17,0	5,1-5,5	10,0-19,0
Горох	30-40	2,0-6,0	4,5-6,5	4,4	–	23,0-33,0

Із численних видів пшениці в світовому землеробстві культивуються головним чином м'які та тверді, які, в свою чергу, поділяють на ярі та озимі. У м'яких пшеницях міститься більше крохмалю, а в твердих – більше білка. Для виробництва солоду рекомендуються м'які сорти пшениці. Зерно жита за хімічним складом наближується до зерна пшениці, але у зерні жита вміст крохмалю менший, ніж у пшениці, та більше сахарів.

Характерною особливістю житнього зерна є наявність у ньому водорозчинних колоїдних полісахаридів – левульозанів, які утворюють при кислотному гідролізі левульозу і тому дістали назву леворину. Найбільшу кількість левульозанів (до 1,5%) містить житнє зерно; в пшениці їх близько 0,4%. Вони відіграють важливу роль при утворенні крохмалю в дозріваючому зерні жита, в якому їх міститься до 33% (на суху речовину). У міру дозрівання зерна левульозами перетворюються в крохмаль. Зерно ячменю за хімічним складом відрізняється від пшениці більшим вмістом клітковини і мінеральних речовин, меншим вмістом крохмалю і білків [29].

Кукурудзу залежно від консистенції ендосперма зерна (борошніста, роговидна), ступеня розвитку роговидної частини і зовнішнього вигляду зерна, поділяють на кілька підвидів: зубоподібна, кремениста, півзубоподібна, крохмалиста, розлусна, цукрова, воскоподібна. Найменшу кількість крохмалю містить кукурудза розлусна – 66%, порівняно із зубоподібною, крохмалистою і кременистою. У зерні кукурудзи міститься від 1,5 до 5% сахарів.

Залежно від будови оболонок плодів розрізняють цукровий горох і луцильний. Цукровий горох культивують на зелений горошок, а луцильний – на продовольчий. Горох як всі бобові культури містить менше крохмалю порівняно зі злаковими культурами (30-50%). Некрохмальні полісахариди: окрім крохмалю, в зернах злаків міститься значна кількість інших високомолекулярних вуглеводів. До них належать целюлоза, геміцелюлоза, гумі- і пектинові речовини. Геміцелюлози становлять майже половину всіх компонентів клітинних стінок оболонок зерна. За своїм фізіологічним значенням вони займають проміжне місце між запасними вуглеводами і опорною тканиною. Целюлоза, входячи поряд з геміцелюлозами до складу клітинних стінок, у поєднанні з лігніном, мінеральними речовинами є основою зовнішніх покривів зерна. Вміст клітковини в злаках неоднаковий: найбагатші клітковиною півчасті культури – просо, овес. Гумі-речовини – це колоїдні речовини, які легко розчиняються у воді з утворенням дуже в'язких розчинів [30].

Основними компонентами геміцелюлоз і гумі-речовин є ліво обертаючий глюкозан або  $\beta$ -глюкан і пентозами, які утворюють при гідролізі арабінозу і ксилозу. Вміст геміцелюлоз у зерні жита коливається від 8 до 12%, а гумі-речовин – від 4 до 5,7%. Між вмістом геміцелюлоз і гумі-речовин існує зворотний зв'язок. Пектинові

речовини являють собою високомолекулярні сполуки вуглеводної природи. Вони складають так звану серединну пластинку, яка склеює оболонки клітин між собою. При повному гідролізі вони можуть утворювати галактуронову кислоту, невеликі кількості галактози, арабінози, оцтової кислоти і метилового спирту. Вміст пектинових речовин у різних злаках приблизно такий (в перерахунку на кальцій пектат, % на суху речовину): ячмінь – 2,19; пшениця – 1,01; кукурудза – 0,59; жито – 1,13; овес – 1,08; рис – 1,13; горох – 3.

Основну частину в зерні та зернопродуктах становлять білкові речовини. Білки входять до складу ядра і протоплазми клітини, клітинних мембран, беруть участь в усіх життєво важливих процесах, які відбуваються в живому організмі, входять до складу ферментів. До складу білків входять такі елементи: вуглець, азот, кисень, водень, сірка. Деякі білки містять фосфор, залізо, йод, мідь, кальцій, магній. За хімічним складом білки поділяють на прості, які при гідролізі утворюють тільки амінокислоти, та складні – сполучення простого білка з якоюсь речовиною. Прості білки (протеїни) за розчинністю поділяють на наступні групи:

- альбуміни – білки, розчинні у воді та сольових розчинах, які містять всі незамінні амінокислоти. Представником їх є лейкози пшениці;

- глобуліни – білки, розчинні в слабких розчинах солей, велика їх кількість міститься в бобових культурах;

- проламіни – білки, розчинні у 60-80%-му етиловому спирті. У великій кількості зустрічаються в зерні злаків: у пшениці та житі – гліадин, в ячміні – гордеїн, у вівсі – авенін, у кукурудзі – зеїн. Проламіни в біологічному відношенні менш цінні білки, оскільки мало чи зовсім не містять лізину, а іноді й триптофану;

- глютеліни – білки, розчинні в слабких (0,2%-х) розчинах лугів. До них належить глютелін пшениці та жита.

До складних білків (протеїнів) відносяться ліпопротеїди – сполуки білка і ліпідів, які входять до складу мембран клітин. Нуклеопропротеїди містять, крім простого білка, нуклеїнові кислоти. Вони входять до складу ядра клітин і протоплазми та відіграють важливу роль в життєдіяльності організму. Характерні властивості й цінність білків визначаються їх амінокислотним складом, який наведено для деяких культур у таблиці 3.3.



Таблиця 3.3

Амінокислотний склад білків зерна (в мг на 100 г сухої речовини зерна)

Показник	Пшениця	Жито	Овес	Ячмінь	Кукурудза	Горох
Незамінні амінокислоти	3257	2770	3328	3233	3151	7615
Валін	486	457	606	534	416	1010
Ізолейцин	411	360	414	385	312	1090
Лейцин	780	620	722	739	1282	1650
Лізин	360	370	384	370	247	1550
Метіонін	180	150	156	180	120	205
Треонін	390	300	332	350	247	840
Триптофан	150	130	152	120	67	260
Фенілаланін	500	450	562	555	460	1010
Замінні амінокислоти	7452	6791	5966	6878	6795	11773

Мінеральні речовини становлять приблизно 0,7-1,5% їстівної частини харчових продуктів. Ці речовини беруть участь у найважливіших обмінних процесах організму – водно-сольовому, кислотно-лужному, відіграють значну роль у побудові кісткової тканини (кальцій, фосфор). Їх поділяють на 2 групи: макроелементи (кальцій, фосфор, натрій, магній, калій, залізо, кремній, хлор, сірка), які містяться в зерні в значних кількостях, і мікроелементи (цинк, мідь, марганець, нікель, кобальт та ін.), концентрація яких невелика [31].

Названі елементи містяться в зерні у вигляді солей фосфорної, сірчаної, рідше соляної кислот або входять до складу органічних сполук. Вміст мінеральних речовин подано у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Вміст макро- і мікроелементів у злаках

Показники	Пшениця	Жито	Овес	Ячмінь	Кукурудза	Горох
Макроелементи, мг						

Калій	323	424	421	453	340	873
Кальцій	50	59	117	93	34	115
Кремній	43	85	1000	600	60	83
Магній	111	120	135	150	104	107
Натрій	8	4	37	32	27	33
Сірка	93	85	96	88	114	190
Фосфор	340	366	361	353	301	329
Хлор	27	40	119	125	54	137
Мікроелементи, мкг						
Алюміній	1450	1670	1370	520	440	1180
Залізо	5140	5380	5530	7400	3700	6800
Йод	4,2	9,2	7,5	8,9	5,2	5,1
Кобальт	4,4	7,6	8	7,9	5,3	13,1
Марганець	3740	2770	5250	1480	1090	1750
Мідь	410	460	600	470	290	750
Цинк	2610	2040	3610	2710	1730	3180

До вітамінів належить група органічних сполук, різноманітних за хімічною природою, наявність яких у їжі необхідна для життєдіяльності людини. Вміст вітамінів у злаках, які використовують для виробництва солоду, наведений у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Вміст вітамінів у злаках (мг або мкг у 100 г сухої речовини зерна)

Показник	Пшениця	Жито	Овес	Кукурудза	Ячмінь	Горох
В і т а м і н Е (токоферол), мг	6,02	5,34	2,8	2,7	5,5	9,1
Вітамін В <sub>1</sub> (тіамін), мг	0,41	0,44	0,58	0,33	0,38	0,81

В і т а м і н В <sub>2</sub> (рибофлавін), мг	0,17	0,2	0,12	0,13	0,14	0,15
П а н т о т е н о в а кислота, мг	1,1	1	1	0,7	0,8	2,2
В і т а м і н РР (ніацин), мг	5,04	1,3	1,5	4,48	2,1	2,2
В і т а м і н В <sub>9</sub> (фолацин), мкг	35	55	27	40	26	16
Вітамін Н (біотин), мкг	8,8	6	15	11	21	13

Вітамін В<sub>1</sub> (тіамін) входить до складу ферментів, які регулюють вуглеводний і амінокислотний обмін. Він необхідний для нормальної діяльності центральної нервової системи. Цього вітаміну багато в бобових культурах і вівсі.

Вітамін РР (ніацин) входить до складу ферментів, які регулюють вищу нервову діяльність і функції органів травлення. У зернових культурах значна частина вітаміну РР перебуває у важко засвоюваних формах. Так, у кукурудзі більша частина ніацину перебуває в зв'язаній формі, яка не засвоюється організмом людини. Ця частина вітаміну стає доступною тільки після інтенсивної теплової або лужної обробки. У бобових культурах зв'язана форма вітаміну РР відсутня. Але цей вітамін в організмі людини може синтезуватися з незамінної амінокислоти триптофану.

Вітамін В<sub>2</sub> (рибофлавін) входить до складу ферментів, які відіграють істотну роль в реакціях окислення в усіх тканинах людини, регулюють обмін вуглеводів, білків і жирів. З рослинних продуктів найбагатші на рибофлавін бобові культури.

Вітамін В<sub>9</sub> (фолацин) – один з вітамінів групи В, недостатність якого виявляється в ураженнях кровотворної і травної систем. Нестача цього вітаміну спостерігається у вагітних жінок у зв'язку з розвитком плоду. Багато його міститься в житі, пшениці, тому основним джерелом вітаміну В<sub>9</sub> у харчуванні є хліб з цих злаків і солодові екстракти.

Вітамін Н (біотин) входить до складу ферментів, які регулюють обмін амінокислот і жирних кислот. У разі нестачі біотину виникає дерматит ніг, рук і щік,

порушуються функції нервової системи. Багато цього вітаміну міститься в сої, горосі, кукурудзі [32].

### 3.1.2. Характеристика ячмінно-солодового екстракту

Через високу харчову та біологічну цінність виробництво солодових екстрактів набуло великого поширення як за кордоном, так і на Україні. Ячмінно-солодові екстракти і створені на їх основі продукти використовуються як дієтичні та лікувальні. Також, вони являють цінність для інших галузей промисловості: кондитерської, пиво безалкогольної, хлібопекарської [33].

Ячмінно-солодовий екстракт являє собою густу рідину, колір якої від світлодо темно-коричневого. Смак солодкий (продукти, які виготовлені з додаванням аскорбінової кислоти, мають кислуватий присмак). Аромат – солодовий (продукти, які виготовлені з додаванням меду, повинні мати виражений аромат і присмак меду). Масова частка речовин у готовому продукті становить  $75\pm 2\%$ , при цьому масова частка цукрів на суху речовину – 75-80%. Енергетична цінність ячмінно-солодового екстракту і продуктів на його основі становить 200-220 ккал/100 г. На екстракт ячмінно-солодовий і продукти на його основі діють технічні умови ТУ 10.04.06.114-88. Харчова і біологічна цінність солодових екстрактів і дієтичних продуктів на їх основі визначається їх хімічним складом [33].

Таблиця 3.6

Хімічний склад ячмінно-солодового екстракту

Показник	Ячмінно-солодовий екстракт
Вміст, %	
Сухі речовини	75,85
Білкові речовини	3,58
Гумі-речовини	4,83
Зола	1,23
Відносна в'язкість при розведенні 1:5	2,1
Кислотність, см <sup>3</sup> 1 моль/дм <sup>3</sup> р-ну NaOH	12

Мінеральний склад продукту, мг/100 г	
Кальцій	10,32
Магній	37,38
Фосфор	100,68
Калій	351,12
Натрій	85,09
Цинк	1,82
Залізо	3,08
Мідь	0,19
Вуглеводний склад продукту, г/100 г	
Декстрини	6,64
Мальтотетроза	1,3
Мальтотриоза	0,5
Мальтоза	24
Сахароза	0,6
Глюкоза	18
Фруктоза	3
Ксилоза	0,6

Результати вмісту білкових речовин, мінерального та вуглеводного складу, не крохмальних полісахаридів, а також кислотності та в'язкості ячмінно-солодового екстракту наведені у таблиці 3.6.

Ячмінно-солодовий екстракт багатий на амінокислоти. Найбільший вміст припадає на частку 8 амінокислот: глютамінова кислота, аланін, валін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін і гістидин. Цінність лікувальних і дієтичних продуктів визначається не тільки поживністю, а й наявністю біологічно активних речовин, серед яких важливе місце належить вітамінам, велика кількість яких міститься у ячмінно-солодовому екстракті [33].

### 3.2. Дослідження оптимального складу поживного середовища для процесу ферментації

Для виробничого біосинтезу використовують поживне середовище на основі знежиреного молока, яке готують так: сухе знежирене молоко розчиняють у водопровідній воді за температури 40-45 °С з розрахунку 3-5 кг сухого молока або 4-6 кг сухої сироватки на 100 кг води, доводять рН до 7,2-7,4 водним розчином аміаку або гідроксидом натрію, стерилізують за температури 121 °С упродовж 10-15 хв, охолоджують до 33-34 °С. Зазначене середовище передбачає значні матеріальні витрати на здійснення процесу, а також в сухому знежиреному молоці значно менше поживних речовин, ніж у молочній сироватці.

Таблиця 3.7

Поживне середовище для процесу ферментації [34]

Традиційне поживне середовище	Удосконалене поживне середовище
Сухе знежирене молоко	Молочна кислота
Вода	Вода
NaOH	NaOH

Поставлене завдання вирішується тим, що в якості живильного середовища використовували молочну сироватку (див. табл. 3.7).

### 3.3. Характеристика молочної сироватки

Молочна сироватка є відходом молочної промисловості, а саме при виробництві сирів, творогу та казеїну. Вченими було доведено, що молочна сироватка являє собою повноцінний кисломолочний продукт, який володіє харчовою цінністю. Велика кількість виробників додають у сироватку різноманітні ароматичні добавки та барвники, які роблять цей напій ще смачнішим і привабливішим для покупців. До складу сироватки входить 93,7% води і 6,3% білка, майже відсутні жири. Найголовнішим компонентом молочної сироватки є лактоза – її у складі не

менше 69%. Також у ній містяться білкові азотисті сполуки, такі, як аргінін, лізин, лейцин, метіонін, гістидин, триптофан і треонін. За фізико-хімічними показниками сироватка повинна відповідати вимогам, наведеним у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Фізико-хімічні показники сироватки [34]

Назва показника	Норма для сироватки	
	Молочної	Молочної кислоти
Масова частка вологи, %, не більше	5	4,5
Масова частка лактози, %, не менше	60	60
Масова частка жиру, %, не більше	2	2

Молочна сироватка багата мікроелементами: кальцієм, фосфором, магнієм, калієм. Треба відзначити, що вміст вітамінів у продукті нічим не менше, ніж у натуральному молоці (А, В, Е, С, РР). Сироватка за органолептичними показниками повинна являти собою однорідну рідину зеленуватого кольору, без сторонніх домішок, мати чистий, властивий молочній сироватці смак (для казеїнової і сирної – кислуватий, для солоної підсирної – від солонуватого до солоного) без сторонніх присмаків і запахів. Сироватка, отримана після часткового видалення білка методом ультрафільтрації (фільтрат), повинна являти собою однорідну прозору рідину зеленуватого кольору; допускається слабка опалесценція [34]. Сироватка не повинна містити патогенних мікроорганізмів. Енергетична цінність солоної сироватки така ж, як і несолоної. За мікробіологічними показниками сироватка повинна відповідати вимогам, наведеним у таблиці 3.9 [34].

Таблиця 3.9

Мікробіологічні показники сироватки [35]

Назва показника	Норма
-----------------	-------

Кількість мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1 г продукту, не більше	1*10 <sup>5</sup>
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи) не дозволено у масі продукту, г	0,1
Кількість пліснявих грибів, КУО в 1 г продукту, не більше	100
Кількість дріжджів, КУО в 1 г продукту, не більше	50

Натуральна молочна сироватка, отримана при переробленні молока на сир кисломолочний, є цінною білково-вуглеводною сировиною для створення широкого спектра різних харчових продуктів, зокрема, напоїв на її основі. Сироватка містить майже всі компоненти молока і має низьку енергетичну цінність, може бути значною мірою використана для виробництва продуктів дієтичної групи. Білкові речовини молочної сироватки представлені лактальбуміновою і лактоглобуліновою фракціями, протеозо-пептонами, казеїновим «пилом» і частками  $\gamma$ -казеїну, який не згортається сичужним ферментом. Окрім білкових сполук у сироватці містяться і небілкові азотисті сполуки: сечовина, пептиди, амінокислоти та ін.

Головними з сироваткових білків є  $\beta$ -лактоглобулін і  $\alpha$ -лактальбумін. На частку  $\beta$ -лактоглобуліну припадає близько половини сироваткових білків або 7-12% загальної кількості білків молока;  $\alpha$ -лактальбумін займає друге місце і на його частку припадає 2-5% загальної кількості білків молока. Сироваткові білки багаті дефіцитними незамінними амінокислотами (лізин, триптофан, метіонін, треонін) і цистеїном, що дозволяє віднести їх до найбільш біологічно цінної частини білків молока. Використання їх в харчових цілях має велике практичне значення. Імуноглобуліни об'єднують групу високомолекулярних білків. Вони виконують функцію антитіл. Небілкові азотисті сполуки є проміжними і кінцевими продуктами азотистого обміну в організмі тварин і потрапляють в молоко саме з крові. Загальна їх кількість становить 30-60 мг % або близько 5% від загального вмісту азоту в молоці. Саме перелічені вище речовини і зумовлюють високу біологічну цінність сироватки молочної. Крім них в сироватці містяться лактоферин, ферменти, вітаміни, гормони, органічні кислоти, імунні тіла та мікроелементи [35].



### 3.4. Технологія отримання Симбітер

Технологія отримання пробіотика Симбітер складається з наступних стадій, вони ж наведені в додатку А.

Стадія ДР (допоміжних робіт). Санітарна підготовка виробництва включає в себе підготовку повітря. У виробничих приміщеннях передбачена ефективна система припливно-витяжної вентиляції повітря. Система припливної вентиляції складається з припливного вентилятора, повітревона, який має повітророзподільні вікна. Система витяжної вентиляції складається з витяжного вентилятора, витяжних парасольок, і повітревона з повітрозабірними вікнами.

Підготовка виробничих приміщень складається з: щоденної, генерального прибирання та контролю мікробної контамінації. Приміщення виробництва лікарських засобів відповідно до МУ 42-51-3-93 поділяються на 4 групи чистоти. У виробництві Біфітену використовуються приміщення 2, 3, 4 класів чистоти. Підготовка приміщення 2-3 класів частоти включає в себе сукупність заходів, які складаються з вологого прибирання, дезінфекції, УФ-опромінення підлоги, стін, стелі та ін. В якості миючих засобів використовується «Лотос» і т.д., а в якості дезінфікуючих засобів – пероксид водню, етанол, хлорамін [36].

В якості матеріалів для протирання стін використовують паралонові губки або серветки з забитими краями з капронових тканин. Для протирання підлог використовують ганчірки з тканин. Прибирання проводиться в спеціально призначених для цього гумових чоботях, гумових рукавичках, гумовому фартусі, а при необхідності – в респіраторі. Після прибирання інвентар протягом 2-3 годин знезаражують шляхом замочування в розчині  $H_2O_2$  (6 %), розчині хлораміну (4 %), або розчині хлорного вапна (5 %). Обробка виробничих приміщень 2 класу чистоти проводиться  $H_2O_2$  (6 %) з миючим засобом .

Щоденне прибирання приміщень 3 класу чистоти проводиться  $H_2O_2$  (1 %) з миючим засобом. Після закінчення обробки приміщення звільняють від персоналу і включають настінні і стельові бактерицидні лампи на 2 години. Генеральне прибирання проводиться один раз на 6 днів. При генеральному прибиранні стелі,

двері та інші поверхні дуже часто змочують робочим розчином з розрахунку 150200 мл/м<sup>2</sup> і закривають приміщення на 30-60 хвилин [37].

Визначення мікробної контамінації повітря проводиться 2 рази на тиждень під час виробничого процесу і 1 раз на 2 тижні безпосередньо після обробки приміщень дезінфікуючими розчинами. Контроль мікробної контамінації повітря здійснюється за допомогою апарату Кротова (відкриту чашку Петрі з щільних середовищем поміщають в апарат Кротова і відбирають пробу протягом 5-х хвилин при швидкості проходження повітря 40 л/хв) або методом седиментації (на 15 хв. відкриті чашки Петрі з МПА і середовищем Сабуро). Після відбору проб апаратом Кротова чашки поміщають в термостат і витримують 20-30 хвилин протягом 2 діб при температурі 20-25 °С і 30-35 °С.

Після відбору методом седиментації при температурі 20-25 °С протягом 3 діб з середовищем Сабуро і при 37 °С протягом 2 діб – з МПА. Допускається не більше 50 неvirобничих мікроорганізмів на 1 м<sup>3</sup> повітря для 2 класу чистоти і не більше 2 колоній мікроорганізмів на одній чашці Петрі. Допускається не більше 100 неvirобничих мікроорганізмів на 1 м<sup>3</sup> повітря для 3 класу чистоти і не більше 5 колоній мікроорганізмів на одній чашці Петрі.

Приготування дезрозчинів:

- Пероксид водню з миючим засобом – прозорі, не мають неприємного запаху, не псують предмети, що обробляються, не корозійні метали, бактерицидна і спороцидна активність підвищується з підвищенням температури.

- Хлорамін (4 %) включена нашатирним спиртом.

- Етиловий спирт (76 %).

- Розчин для обробки рук С-4 «первомур» – суміш Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> і мурашиної кислоти, в якій в процесі приготування утворюється надмурашина кислота, яка має високу бактерицидну і спороцидну активність.

- Стериліум – фармакологічний, антисептичний препарат для обробки рук на основі пропанолу і мецетроніум етилсульфату. Інактивує навіть віруси СНІДу, гепатиту В.

Підготовка обладнання до роботи складається з: підготовки касет і контейнерів для миття і стерилізації ампул, апарату для миття ампул, бюретки-дозатора, касети

для розливу препарату, морозильної камери сублімаційної установки і контролю мікробної контамінації техобладнання. Устаткування підлягає обробці, яке безпосередньо стикається з препаратом: обладнання для приготування та розливу в ампули, обладнання для сушки сублімації препарату та ін [38].

В якості миючих засобів використовують «Лотос», а в якості деззасобів – пероксид водню, спирт. Прибирання та дезінфекція обладнання проводять аналогічно підготовці приміщень. Використовуваний технологічний одяг – комплект одягу без ворсової тканини, призначений для захисту матеріалів, напівпродуктів або готового продукту від контамінації мікроорганізмів виділяється персоналом [39].

Санітарний одяг складається з халата, тапочок, косинки або шапочки. Обробка технологічного одягу включає в себе прання, висушування і стерилізацію. Стерилізацію одягу та рукавичок проводять в автоклавах (ГФ-13) при 120 тиску 1,1 кгс/см<sup>2</sup> 45 хвилин. Контроль мікробної контамінації здійснюється мікробіологом 2 рази на тиждень під час виробничого процесу в кожному виробничому приміщенні 2-3 класу чистоти вибірково і 1 раз в 2 тижні – після стерилізації одягу.

Вимоги до персоналу:

- Персонал проходить регулярні медичні огляди;
- Персонал, який робить візуальний контроль лікарських препаратів проходять регулярні огляди окулістів;
- Не допускаються до роботи (2-3 клас) носії патогенної мікрофлори, люди які мають алергічні та шкірні захворювання;
- Дотримання особистої гігієни;
- Регулярно приймає душ, миє голову не менше 2 разів на тиждень, забороняється користуватися косметикою, носити годинники, ювелірні вироби.

По приходу персонал в гардеробній знімає верхній одяг, одягає одяг і взуття, проходить в передбокснику знімає перехідний одяг миє і дезінфікує руки і бере комплект стерильного одягу і пакет із стерильним взуттям.

Допоміжні роботи включають в себе підготовку ампул (їх укладання в касети, мийки, стерилізації), мікробіологічного посуду (мийка, стерилізація) приготування поживних середовищ, 0,05 % фізіологічного розчину натрію хлориду, наповнювача, барвників.

Стадія ТП (технологічний процес). При виробництві Симбітеру використовуються біфідобактерії, лактобактерії, пропіоновокислі, оцтовокислі бактерії. Технологія одержання мультипробіотика Симбітер відрізняється від класичних технологій виробництва пробіотиків способом підготовки інокулянту і проведенням стадії виробничого біосинтезу, на яких здійснюють спільне культивування виробничих штамів мікроорганізмів.

Посів ліофілізованих мікроорганізмів: музейні штами мікроорганізмів зберігаються за температури 4 °С. Перед початком технологічного процесу культури відновлюють, здійснюючи кілька послідовних пересів у рідких середовищах: біфідобактерії у середовищі Біфідум (38 °С, 70-72 год); Пропіоновокислі бактерії у синтетичному або кукурудзяно-глюкозиному середовищі (30 °С, 70-72 год); оцтовокислі бактерії у 56 середовищі Лойцяньської (30 °С, 70-72 год); Лактобактерії у середовищі МРС (37 °С, 24 год).

Одержання проміжного інокулянту: на цій стадії паралельно отримують 2 типи посівного матеріалу: біфідобактерії – пропіоновокислі – оцтовокислі бактерії та лактобактерії – оцтовокислі бактерії.

Інокулянт біфідо-, пропіоново-, оцтовокислих бактерій: на молочному середовищі (Сухе знежирене молоко або суху молочну сироватку розчиняють у водопровідній воді за температури 40-45 °С з розрахунку 3-5 кілограм сухого молока або 4-6 кілограм сухої сироватки на 100 кілограм води, доводять рН до 7,2 -7,4 водним розчином аміаку або гідроксидом натрію, стерилізують за температури 121 °С упродовж 10-15 хвилин, охолоджують до 33-34°С), здійснюють спільне культивування біфідобактерій *B.bifidum* з пропіоновокислими бактеріями *P.acidipropionici*, *P.freudenreichii* і оцтовокислими бактеріями *A.aceti* та *A.pasteurianus*. Культури поєднують за оптичною густиною клітинної суспензії у співвідношенні *B.longum*, *B.bifidum*, *P.acidipropionici*, *P.freudenreichii*, *Acetobacter* 2:2:1:2:1. Суміш перемішують та витримують протягом 6-12 годин за температури 33-34 °С. Здійснюють 8-10 послідовних переносів у молочному середовищі.

Упродовж послідовних пересівів і після закінчення стадії одержання інокуляту біфідо-, пропіоново- та оцтовокислих бактерій проводять мікробіологічний

контроль на наявність сторонньої мікрофлори і для перевірки співвідношення монокультур в асоціації виробничих штамів.

Інокулят лакто- та оцтовокислих бактерій: здійснюють спільне культивування у молочному середовищі молочнокислих бактерій *L.lactis*, *L.lactis ssp. cremoris*, *L.lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis*, *S.thermophilus*, *L.acidophilus*, *L.helveticus*, *L.delbrueckii ssp. bulgaricus* та оцтовокислих бактерій *A.aceti* та *A.pasteurianus*. Штами молочнокислих бактерій поєднують з оцтовокислими бактеріями за оптичною густиною клітинної суспензії у співвідношенні 2:1. Суміш перемішують і витримують упродовж 6-12 год за температури 33-34°C. У процесі культивування у середовищі накопичується до 215 мг амінного азоту за рахунок протеолізу молочних білків. Здійснюють 8-10 послідовних пересівів у молочному середовищі [40].

Упродовж послідовних пересівів і після закінчення стадії одержання інокуляту лакто- й оцтовокислих бактерій проводять мікробіологічний контроль на наявність сторонньої мікрофлори і для перевірки співвідношення монокультур в асоціації виробничих штамів.

Одержання основного інокуляту: на цій стадії інокулят молочно- та оцтовокислих бактерій поєднують з інокулятом біфідо-, пропіоново- та оцтовокислих бактерій за оптичною густиною клітинної суспензії у співвідношенні 1:3. Суміш перемішують та витримують у молочному середовищі впродовж 6-12 год за температури 33-34 °С. Таке співвідношення двох проміжних інокулятів найсприятливіше для забезпечення постійності складу та властивостей препарату Симбітер. Зміна співвідношення у бік підвищення інокуляту біфідо-, пропіоново- та оцтовокислих бактерій призводить до зниження молокозгортальної активності посівного матеріалу і втрати стабільності складу симбіозу під час пересівів. Збільшення вмісту проміжного інокуляту молочно- та оцтовокислих бактерій супроводжується зменшенням у симбіозі чисельності фізіологічно важливих мікроорганізмів та подальшим зменшенням їхньої кількості під час пересівів, що значно знижує лікувально-профілактичні властивості препарату.

Після закінчення стадії одержання основного інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль на наявність сторонньої мікрофлори і для перевірки

співвідношення монокультур в асоціації виробничих штамів, а також визначають специфічну активність [41].

Виробничий біосинтез: отриманий на попередній стадії інокулят змішаної культури молочнокислих, пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій послідовно пересівають 5-6 разів у стерильне молочне середовище. Культивування проводять упродовж 6-12 год за температури 33-34 °С.

Після закінчення процесу здійснюють мікробіологічний контроль на наявність сторонньої мікрофлори і для перевірки співвідношення монокультур в асоціації виробничих штамів, а також визначають специфічну активність. Одержання напівфабрикату Симбітер Отриману на попередній стадії культуральну рідину змішують із захисним середовищем сушіння у співвідношенні 1:1. Як захисне середовище сушіння використовують 10%-й розчин сахарози з додаванням 5% лимоннокислого натрію тризаміщеного. Наступні стадії передбачають стерильний розлив напівфабрикату у флакони та сублімаційне сушіння [41].

### **3.5. Обґрунтування вибору ферментера**

Стадія ферментації – це центральний і самий важливий етап біотехнологічного виробництва. Ферментація являє собою сукупність послідовних операцій від внесення заздалегідь підготовленого посівного матеріалу на поживні середовища до завершення процесів росту і біосинтезу внаслідок вичерпування поживних речовин із середовища. Основне призначення ферментера – завчасно забезпечити мікробні клітини необхідними поживними речовинами та киснем, а також відвести продукти обміну речовин. Від якості та технічних характеристик ферментера залежить кінцевий результат всього виробничого процесу, саме тому при виборі ферментаційного обладнання приділяють велику увагу.



Рис. 3.1. Ферментер Biorus 700 L

Для культивування обираємо ферментер в якому відбувається аерація, оскільки деякі з продуцентів є аеробами, тому потрібна система подавання повітря. На рис. 3.1 зображено біореактор для вирощування бактерій. Технічні характеристики ферментера Biorus 700 L:

- продуктивність – 150 кг/год,
- розміри: об'єм – 500 м<sup>3</sup>, висота – 4 м.
- потужність – 75 кВт,
- вага – 10000 кг,
- максимальна температура охолодження конденсатора – -75 °С.

## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

#### **4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори на виробництві пробіотичного препарату Симбітер**

Згідно ГОСТ 12.0.003-74 Небезпечні і шкідливі виробничі фактори поділяються за природою дії на наступні групи: фізичні, хімічні, біологічні, психофізіологічні. На стадії виробництва пробіотику Симбітер на працівників можуть впливати такі шкідливі фактори: фізичні, хімічні та біологічні. Фізичні включають в себе:

- недостатню освітленість робочої зони;
- мікроклімат (підвищена температура повітря робочої зони);
- підвищений рівень шуму та вібрації на робочому місці.

Хімічні шкідливі фактори включають в себе хімічні речовини, що здатні проникати через органи дихання та подразнюють їх. Біологічні шкідливі фактори включають в себе мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності.

Недостатня освітленість робочої зони: освітлення в цеху по виробництву пробіотика Симбітер повинне відповідати вимогам ДБНВ.2.5-28-2006. Раціональне освітлення виробничого приміщення сприяє зменшенню зорової та загальної втоми, автозаміна також травматизму [42].

Недостатня освітленість може виникати внаслідок віддаленості природних джерел світла від робочого місця, оскільки робота в виробничому цеху може проводитись по всій території приміщення, у залежності від розміщення нерухомих приладів або спеціально обладнаних робочих місць. Майже вся частина цеху освітлюється переважно штучними джерелами світла, що можуть не достатньо освітлювати робоче місце.

При недостатньому освітленні людина працює менш продуктивно, швидко втомлюються, зростає потенційна небезпека помилкових дій і нещасних випадків. Погане освітлення може призвести до порушень функції зорового аналізатора,



розвитку професійних захворювань. Не повинно бути надмірного освітлювального потоку, різних контрастів, затінення. Підвищена температура повітря робочої зони. Процеси стерилізації апаратури (інокуляторів, посівних апаратів, ферментерів), комунікацій (матеріальних і посівних ліній) потребують постійного нагріву обладнання. Розгалужена система комунікацій і апарати великої ємкості до 50 м<sup>3</sup> є інтенсивними джерелами надходження надлишкового тепла у виробничі приміщення. В зв'язку з цим температура повітря може значно підвищуватися в момент стерилізації апаратів і перевищувати норму на 2-6 °С. Відносну вологість в цех виникає на стадії виділення води з біомаси. Підвищений рівень шуму. Допустимі норми шуму для промислових підприємств, де є обладнання, що створює шум, згідно з ГОСТ 12.1.003-86. В цеху по виробництві антибіотика джерелами шуму є технологічне обладнання, установки, ферментери, двигуни.

До хімічних небезпечних факторів можна віднести миючі та дезінфікуючі засоби, які можуть мати подразнюючу та алергенну дію на організм людини. В цеху по виробництву пробіотику Симбітер використовуються такі хімічні речовини, як стериліум, мікробак – форте. Джерелом бактеріального забруднення повітряного середовища приміщень ферментації є розбризкані проби біомаси з апаратів, що періодично відбираються працівниками для здійснення контролю росту продуценту *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*.

#### **4.2 Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при виробництві пробіотику Симбітер**

Для заглушення шумів у виробничому приміщенні: при виробництві пробіотику Симбітер роблять звукоізоляційну обробку приміщень, яка полягає в розміщенні на внутрішніх поверхнях приміщень звуко-поглинаючі матеріали, в якості яких використовують: надтонке скловолокно, капронове волокно, ізоляційну вату, полістерол та ін. У випадках, коли зменшити шум до допустимої величини загально-технічними заходами неможливо, застосовують засоби індивідуального захисту:

- використання засобів захисту слуху;
- мінімальні динамічні навантаження, правильний монтаж обладнання;
- правильна експлуатація обладнання, своєчасне проведення ремонтів;
- проведення санітарно-профілактичних заходів (раціональні режими праці і відпочинку, профогляди та ін.) для працюючих.

Для того щоб визначити температуру повітря у виробничих приміщеннях використовують спиртові та ртутні термометри, термопари або термоанемометри. Швидкість руху повітря в приміщеннях вимірюють приладами: анемометрами, термоанемометрами. Відносну вологість повітря визначають стаціонарними або аспіраційними психрометрами [43].

Для зменшення паро-бар'єру у виробничих приміщеннях потрібно уникнути технологічних процесів, де є відкриті поверхні рідин, з яких вони випаровуються. Технологічні прилади повинні бути герметизовані, а для видалення пари – оснащене потужними витяжками. Як засіб видалення паро-бар'єру з повітря приміщень повинна обов'язково використовуватись вентиляція. В приміщеннях де діють оптимальні норми мікроклімату, слід встановлювати апарати для кондиціонування повітря. Кратність повітрообміну у виробничому цеху по виробництву пробіотиків розраховується наступним чином:

$$n=l/ V_{п}$$

$$n=9073,32/1500=6,05 \text{ год}^{-1}$$

Об'ємом  $V_{п} = 1500 \text{ м}^3$ , для видалення надлишкової вологи, якщо площа поверхні випаровування води  $F=50 \text{ м}^2$ . Швидкість руху повітря над витокм випаровування  $V = 0,1 \text{ м/с}$ . Фактор гравітації рухливості навколишнього середовища беремо  $\lambda = 0,028$ . Тиск водяної пари в навколишньому середовищі повітря  $P_1 = 42,55 \text{ гПа}$ . Тиск водяної пари, що насичує повітря приміщення  $P_2 = 74,55 \text{ гПа}$ . Кількість водяної пари в повітрі, що видалається з приміщення  $d_{\text{вид}} = 17,25 \text{ г/м}^3$ . Кількість водяної пари у повітрі, що надходить у приміщення  $d_{\text{пос}} = 12,88 \text{ г/м}^3$ . Для видалення надлишкової вологи із приміщення продуктивність вентиляції,  $\text{м}^3/\text{год}$ , розраховуємо за формулою:

$$L=(1000 \times W_{\text{над}})/\rho \times (d_{\text{вид}} - d_{\text{пос}})$$

де  $\rho$  – питома густина повітря (у нормальних умовах становить 1,2 кг/м<sup>3</sup>).

Причому:

$$W_{\text{над}} = F \times (\lambda + 0,0174 \times V) \times (P_2 - P_1)$$

$$W_{\text{над}} = 50 \times (0,028 + 0,0174 \times 0,1) \times (74,55 - 42,55) = 47,58 \text{ ккал/год}$$

Тоді:

$$L = (1000 \times 47,58) / 1,2 \times (17,25 - 12,88) = 9073,23 \text{ м}^3/\text{год}$$

Кратність повітрообміну визначаємо за формулою:

$$n = L / V_{\text{п}}$$

$$n = 9073,32 / 1500 = 6,05 \text{ год}^{-1}$$

Отже, кратність повітрообміну у виробничих приміщеннях достатній для забезпечення оптимальних мікрокліматичних умов [44].

Для профілактики захворювання очей у першу чергу необхідно звернути увагу на дотримання режимів праці та відпочинку, на правильне розміщення ПК та монітору зокрема (щоб центр екрана дисплея був нижчий від кута зору людини), на використання моніторів з покращеними характеристиками і на забезпечення раціонального освітлення робочого місця. З метою профілактики несприятливого впливу електромагнітного випромінювання від комп'ютера на користувача необхідно:

- встановити на робочому місці монітор, що відповідає сучасним вимогам;
- стосовно захисту від випромінювання;
- не концентрувати на робочому місці великої кількості радіоелектронних;
- пристроїв;
- вимикати екран, якщо на ньому не працюють, але знаходяться неподалік.

Експлуатація бактерицидних установок повинна здійснюватися відповідно вимогам, вказаним в паспорті на виробі і інструкції з експлуатації. Бактерицидні лампи, що відробили термін служби, повинні бути замінені новими. Для цього необхідно вести облік часу роботи опромінювачів у приміщенні. До експлуатації бактерицидних установок слід допускати тільки персонал, що пройшов необхідний інструктаж з охорони праці. Знезараження повітряного середовища здійснюється

тільки у відсутності людей – в перерві між роботою або у спеціально відведений для цього час.

Лікарсько-профілактичні заходи передбачають проведення систематичних медичних оглядів працівників, які перебувають у зоні дії електромагнітного поля, обмеження в часі перебування людей в зоні підвищеної інтенсивності електромагнітних випромінювань [44].

Для захисту від надмірного ультрафіолетового випромінювання застосовують захисні екрани: хімічні (хімічні речовини, креми, що поглинають випромінювання) і фізичні (перешкоди, що поглинають або розсіюють промені). Очі слід захищати окулярами із захисним склом відповідно до ГОСТ 12.4.013–97. Повний захист від ультрафіолетового випромінювання усіх хвиль забезпечує флінтглас (скло, що вміщує оксид свинцю) товщиною 2 мм.

Зниження інтенсивності опромінення ультрафіолетовим випромінюванням досягається також спеціальним фарбуванням приміщень, раціональним розташуванням робочих місць. Пропонується подачу і відключення живлення бактерицидних ламп від електричної мережі здійснювати за допомогою окремих вимикачів, розташованих зовні приміщення біля входних дверей [45].

### **4.3. Забезпечення пожежної і вибухової безпеки при виробництві пробіотичного препарату Симбітер**

Відповідно до ГОСТ 12.1.004–91 пожежна безпека об'єкта повинна забезпечуватися системою запобігання пожежі, системою протипожежного захисту і системою організаційно–технічних заходів [40, 45]. При виробництві пробіотику Симбітер можливі такі джерела пожежі:

- перегрів електричних установок і мереж;
- необережне поводження з вогнем (паління в неналежних місцях, порушення правил при вогневих роботах);
- порушення правил експлуатації електрообладнання (перевантаження, короткі замикання, порушення ізоляції при застосуванні електронагрівальних приладів у приміщеннях з наявністю парів легкозаймистих рідин і газів і т.д.);

- порушення технологічного процесу виробництва і правил пожежної безпеки;
- коротке замикання;
- іскри, що можуть виникати під час роботи електричних двигунів;
- розпечені або нагріті стінки апаратів та обладнання;
- використання відкритого вогню факелів.

З метою попередження пожежі необхідно: проводити інструктажі з пожежної безпеки; дотримуватись правил протипожежної безпеки; перевіряти електрообладнання. Заходи з пожежної профілактики поділяються на:

- організаційні;
- технічні;
- режимні;
- експлуатаційні.

Організаційні заходи завбачують правильну експлуатацію устаткування будівель, території, своєчасний інструктаж працюючих з пожежної небезпеки, проведення занять з пожежно-технічного мінімуму, перевірку їх готовності до пожежогасіння, тренування, створення пожежно-технічних комісій та ін Цех повинен бути забезпечений загальнооб'єктивними протипожежними інструкціями, що регламентують особливості утримання протипожежних розривів, під'їздів до будівлі і джерел води, зберігання речовин і матеріалів, режим паління, утримання засобів пожежогасіння у справному стані, виклик пожежної охорони.

До технічних заходів відноситься дотримання протипожежних норм і правил при конструюванні та проектуванні будівель, обладнання, утримання в справному стані устаткування, суворий контроль за дотриманням правил експлуатації обладнання та дотримання правил та інструкцій з протипожежної безпеки, застосування автоматичних пристроїв виявлення, оповіщення та гасіння пожеж.

До заходів пожежної профілактики при проектуванні і будівництві належать: підвищення вогнестійкості будівель та споруд; зонування території (планування з урахуванням ознак пожежної небезпеки); протипожежні розриви; протипожежні перешкоди; забезпечення безпечних шляхів евакуації (не менше двох виходів); видалення з приміщення диму при пожежі (застосування аераційних ліхтарів,

димових люків, легкоскридних конструкцій); дотримання протипожежних вимог до систем опалення та кондиціонування повітря.

Заходи режимного характеру регулюють режим і правила роботи. Куріння допускається тільки у спеціально відведених місцях, обладнаних урнами і ємностями з водою. У цих місцях повинні бути вивішені написи «Місце для куріння» Експлуатаційними заходами є своєчасні ремонти, огляд, випробування обладнання.

Пожежного захисту в цеху по виробництві пробіотику Симбітер досягають за допомогою:

- засобів пожежогасіння та відповідних видів пожежної техніки;
- автоматичних установок пожежної сигналізації та пожежогасіння;
- основних будівельних конструкцій і матеріалів з нормованими показниками пожежної небезпеки;
- просочування горючих конструкцій антипіренами та нанесення їх на поверхні вогнезаймистих матеріалів;
- пристроїв, які обмежують поширення пожежі;
- своєчасного оповіщення та евакуації людей;
- засобів протидимного захисту.

Відповідно до ГОСТ 12.1.010–76 джерелами ініціювання вибуху є:

- відкрите полум'я, гарячі і розпечені тіла;
- електричні розряди;
- теплові прояви хімічних реакцій та механічних впливів;
- іскри від удару і тертя;
- ударні хвилі;
- електромагнітні та інші випромінювання.

Для попередження вибуху необхідно виключити: вибухонебезпечного середовища; виникнення джерела ініціювання вибуху. Запобігання виникнення джерела ініціювання вибуху має забезпечено:

- регламентацією вогневих робіт;
- запобіганням нагріву устаткування до температури самозаймання вибухонебезпечного середовища;

- застосуванням засобів захисту від атмосферного і статичної електрики, блукаючих струмів, струмів замикання на землю;
- застосуванням швидкодіючих засобів захисного відключення можливих електричних джерел ініціювання вибуху;
- усуненням небезпечних теплових проявів хімічних реакцій і механічних впливів [46].

Запобігання впливу на працюючих небезпечних і шкідливих виробничих факторів, які виникають в результаті вибуху, і збереження матеріальних цінностей забезпечуються:

- встановленням мінімальних кількостей вибухонебезпечних речовин, що застосовуються в даних виробничих процесах;
- застосуванням вогнеперепинювачів, гідрозатворів, водяних і пилових заслонів, інертних (не підтримують горіння) газових або парових завіс;
- застосуванням обладнання, розрахованого на тиск вибуху;
- обваловки і бункерування вибухонебезпечних ділянок виробництва або розміщенням їх в захисних кабінах;
- захистом обладнання від руйнування під час вибуху за допомогою пристроїв аварійного скидання тиску (запобіжні мембрани і клапани);
- застосуванням швидкодіючих відсічних і зворотних клапанів;
- застосуванням систем активного придушення вибуху;
- застосуванням засобів попереджувальної сигналізації.

У виробничих процесах з метою забезпечення вибухобезпеки слід контролювати:

- технологічний режим;
- склад атмосфери виробничих приміщень;
- технологічне обладнання;
- електрообладнання.

Промислові будівлі забезпечені засобами захисту від атмосферної і статичної електрики, встановлені блискавковідводи на видовжених конструкціях. Проводиться періодичний контроль електрообладнання [46].

## РОЗДІЛ 5

### ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

#### **5.1. Виробничі фактори виробництва Симбітер, що впливають на навколишнє середовище**

Проблема профілактики негативного впливу біологічних чинників виробничого середовища на організм людини та навколишнє середовище набуває все актуальнішого соціально-гігієнічного й медико-біологічного значення. При отриманні Симбітеру споживається велика кількість води та повітря, які забруднюються мікроорганізмом-продуцентом, органічними та мінеральними речовинами. Склад стічних вод та відпрацьованого повітря дуже складний.

У процесі виробництва Симбітеру робітники підпадають під вплив таких виробничих чинників, як мікроклімат та біологічний фактор, до якого належить багатокомпонентний органічний пил, що включає патогенну мікрофлору [47]. Мікроорганізми зазвичай не вважаються патогенними для людини, проте інколи здатні викликати отруєння їжі токсинами. Їх спори здатні виживати при значному та тривалому нагріванні, тому не вмирають при звичайних методах приготування їжі. При проростанні спор при зберіганні продуктів, ці бактерії викликають утворення слизкого шару на поверхні продуктів, за що відповідають довгі полісахариди, які вони секретують. При неправильному поводженні в лабораторії з даними мікроорганізмами можливе виникнення отруєння працівників.

У повітрі ці бактерії знаходяться у вигляді спор завдяки їхньому пасивному та активному розсіюванню, причому їхня кількість залежить від багатьох факторів. Вивчення мікобіоти повітря має важливе санітарно-гігієнічне та фітопатологічне значення. Підвищена кількість бактерій у повітрі виробничих приміщень під час виробництва пробіотичного препарату Симбітер негативно впливає на здоров'я персоналу. Потрапляючи в легені при диханні, спори можуть осідати на слизових оболонках та уражувати їх внаслідок заселення та виділення токсичних речовин.



Ступінь ураження та клінічні прояви захворювання залежать від кількості спор у повітрі, чутливості та імунного статусу організму [48].

За даними літератури, вплив на здоров'я працюючих здійснюють не лише спори/клітини бактерій, але й клітинні фрагменти, яким досі приділяють мало уваги. Доведено, що дрібні частинки (менше 2,5 мкм) чітко зумовлюють побічні ефекти на здоров'я людей. Встановлено, що значна кількість імунологічно активних часток мають розміри суттєво менші, ніж спори, що виділяються з поверхонь, забруднених грибами. Дуже маленькі частинки (0,3 мкм) кількісно перевищували кількість спор більш ніж у 320 разів. Проблема розпізнавання таких часток полягає в тому, що дрібні й дуже дрібні клітинні фрагменти неможливо виявити традиційними методами дослідження зразків біоаерозолів. Проте попередніми знахідками фрагментів міцелія (великі фрагменти, що виявляються при світловій мікроскопії) підтверджена така можливість.

Показано, що концентрація фрагментів бактерій у повітрі приміщень досягає рівня від 29 до 146 частинок у 1 м<sup>3</sup>, тобто до 6,3 % усіх елементів. Бельгійські вчені повідомили, що частинки бактерій часто відриваються від забруднених поверхонь і деякі з цих фрагментів залишаються життєздатними і можуть проростати. Бактеріальні клітини можуть викликати захворювання алергенного характеру. У осіб з серйозними імунодефіцитними станами може бути пряма інфекція. Основним шляхом потрапляння бактерій та їх спор в організм є шлунковокишковий тракт та органи дихання [49].

## **5.2. Методи очистки стічних вод при виробництві пробіотичного препарату Симбітер**

З метою уникнення забруднень навколишнього середовища необхідно очищати стічні води виробництва Симбітеру. Існують механічні, фізико-хімічні та біологічні методи очистки стічних вод.

Суть механічного методу полягає в тому, що із стічних вод видаляють механічні домішки (нерозчинні). Механічне очищення дозволяє видаляти з стічних вод до 60–75 % нерозчинних домішок. Цей метод очистки стічних вод є найбільш

дешевим. Спорудження для механічної очистки стічних вод: решітки (або УФС – установка фільтрувальна самоочищаюча) і сита; пісколовки; первинні відстійники; мембранні елементи [50].

Для затримання великих частинок органічного і неорганічного походження застосовують решітки і сита. Максимальна ширина складає 16 мм. Далі стоки проходять через пісколовки, де відбувається осадження дрібних частинок під дією сили тяжіння і жироловки, за допомогою якої відбувається видалення з поверхні води гідрофобних речовин шляхом флотації.

Для звільнення стічних вод від дуже маленьких частинок застосовують фільтрування шляхом пропускання через шар зернистого матеріалу. Досить поширеними є мембранні фільтри. Після такої очистки стічні води направляють на первинні відстійники для видалення зважених частинок, здебільшого органічного походження [51]. Як показали дослідження, в осад випадає більше 80 % зважених речовин. Зниження БСК складає 20-30 %. Так, кору видаляють зі стічних вод за допомогою барабанних і сітчастих фільтрів. Волокна фільтрують через сітчасті фільтри з подальшим відстоюванням в горизонтальних або вертикальних відстійниках.

Механічну очистку як самостійний метод застосовують тоді, коли освітлена вода після цього способу очистки може бути використана в технологічних процесах виробництва і спущена у водойми без порушення їх екологічного стану. У всіх 72 інших випадках механічна очистка слугує першим етапом очистки стічних вод [52].

Фізико-хімічна очистка полягає в тому, що в стічні води вводять речовинуреагент (коагулянт чи флокулянт). Вступаючи в хімічну реакцію з домішками, які знаходяться у воді, ця речовина сприяє повному видаленню нерозчинних домішок, колоїдів і частини розчинних з'єднань. При цьому зменшується концентрація шкідливих речовин в стічних водах, розчинні з'єднання переходять в нерозчинні чи розчинні, але не шкідливі, змінюється реакція стічних вод (відбувається їх нейтралізація) тощо. В залежності від необхідного ступеня очистки стічних вод фізико-хімічна очистка може бути завершальною чи другою стадією перед біологічною. Найчастіше з фізико-хімічних методів застосовуються коагуляція, окислення, сорбція, екстракція і т.д.

Серед методів очищення стічних вод велику роль відіграє біологічний метод, заснований на використанні закономірностей біохімічного і фізіологічного самоочищення річок й інших водоймищ. Біологічна очистка передбачає деградацію органічних речовин стічних вод мікроорганізмами (бактеріями і найпростішими). На даному етапі відбувається мінералізація стічних вод, видалення органічного азоту і фосфору, головною метою є зниження БСК<sub>5</sub>. Можуть використовуватися як аеробні, так і анаеробні організми. Очисні установки біологічної очистки можна розділити на два основних типи:

- установки, в яких очистка відбувається в умовах, близьких до природних;
- установки, в яких очистка відбувається в штучно створених умовах.

До першого типу відносяться установки, в яких відбувається фільтрування очищаючих стічних вод через ґрунт (поля зрошування і поля фільтрації) і установки, які представляють собою водойми (біологічні ставки) з проточною водою. В таких установках дихання мікроорганізмів киснем відбувається за рахунок безпосереднього поглинання його з повітря. Кліматичні умови і велика площа, яка використовується обмежує розвиток природних методів очистки стічних вод. В установках другого типу мікроорганізми дихають киснем за рахунок подачі його через поверхню води (реаерація) чи за рахунок механічної аерації. В таких умовах процес очистки відбувається більш інтенсивно, так як створюються кращі умови для розвитку активної життєдіяльності мікроорганізмів [53].

Важливим є те, що навіть 90-95 % технічна ефективність споруд біологічної очистки (біоставки, поля зрошування, поля фільтрації) не гарантує достатнього видалення зі стічних вод органічних речовин. Біологічно очищені стічні води мають високу кольоровість (до 400 °С). Запах стічних вод зникає при розведенні в 200 разів. ХСК біологічно очищених вод досягає 280-350 мг О<sub>2</sub>/л. При відведенні таких стічних вод у поверхневі водойми вода в них має неприємний запах на відстані до 20 км нижче ділянки випуску. Він зникає лише при розведенні в 2-5 разів. У 3-4 рази зростає кольоровість води у водоймах, різко знижується концентрація розчиненого у воді кисню. У десятки разів зростає вміст завислих частинок.

З технічної точки зору розрізняють декілька варіантів штучної біологічної очистки. На даний момент основними є активний мул (аеротенки), біофільтри і

метанотенки (анаеробне бродіння). У біофільтрах стічні води пропускаються через шар грубозернистого матеріалу, покритого тонкою бактерійною плівкою. Завдяки цій плівці інтенсивно протікають процеси біологічного окислення. Саме вона служить діючим початком в біофільтрах.

Аеротенки – величезні резервуари із залізобетону. Тут очисне начало – активний мул з бактерій і мікроскопічних організмів. Бактерії склеюються в 74 пластівці і виділяють ферменти, що мінералізують органічні забруднення. Мул з пластівцями швидко осідає, відділяючись від очищеної води. Інфузорії, джгутикові, амеби, коловертки й інші найдрібніші тварини, пожираючи бактерії, що не злипаються в пластівці, омолоджують бактерійну масу мулу.

Особливістю анаеробних методів очистки є отримання в якості концентрованих кінцевих продуктів метану та CO<sub>2</sub>. При використанні таких методів не потрібна аерація і утворюється незначна кількість надлишкового мулу. Особливістю аеробних методів очистки є забезпечення водних біоценозів киснем. Кисень використовується для окислення забруднювачів, які містяться у воді шляхом отримання мінеральних з'єднань і біомаси.

При анаеробному розкладанні органічних речовин з утворенням метану лише 8 % енергії витрачається на приріст біомаси, 3 % складають теплові витрати і 89 % переходить в метан. Анаеробні мікроорганізми ростуть дуже повільно і потребують велику концентрацію субстрату.

Аеробний процес:  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{мікробна біомаса} + \text{тепло}$ .

Анаеробний процес:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2 + \text{мікробна біомаса} + \text{тепло}$ .

Очищення стоків з високою концентрацією забруднюючих речовин краще використовувати анаеробний метод очистки. Перевагою цього методу в порівнянні з аеробним є отримання енергетично цінного біопалива. Також, слід відзначити, що анаеробний процес здійснюється при невеликих потребах в електроенергії, не потребує додаткових поживних речовин в процесі ферментації, майже не вимагає технологічного обслуговування, відсутність запаху, оскільки реактор закритий. Інтенсивність процесу очистки стічних вод в тій чи іншій установці визначається окислювальною потужністю установки, під якою розуміють число грамів кисню, який отримують з 1 м<sup>3</sup> установки за добу і використовують для зниження біологічної

потреби в кисні стічних вод, окислення амонійних солей до нітритів і нітратів, а також для підвищення вмісту в стічних водах розчинного  $75$  кисню. Окислювальна потужність для різних установок коливається в широких межах.

Для остаточного знезараження стічних вод, які скидаються у природні водойми застосовують установки ультрафіолетового опромінювання. Для знезараження біологічно очищених стічних вод разом з ультрафіолетовим опроміненням застосовують також хімічну обробку – хлором або хлорним вапном впродовж 30 хвилин. Хлорування застосовують також для видалення речовин, що мають неприємний запах [54-60]. Для дезинфекції використовують і фізикохімічні прийоми (ультразвук, електроліз, озонування та ін.) [61].

### **5.3. Заходи щодо поліпшення впливу виробництва Симбітеру на організм людини**

З метою уникнення негативного впливу бактерій на організм людини рекомендовано дотримуватись наступних заходів безпеки:

- До технологічних заходів відносяться такі як автоматизація та механізація процесів виробництва Біфітену, дистанційне керування процесом, герметизація резервуарів.

- Санітарно-технічні заходи: обладнання робочих місць місцевою витяжною вентиляцією або переносними місцевими відсмоктувачами.

- Лікувально-профілактичні заходи: організація і проведення попередніх та періодичних медичних оглядів, дихальної гімнастики, лужних інгаляцій, забезпечення лікувально-профілактичним харчуванням і молоком та ін.

- Особлива увага повинна приділятися застосуванню засобів індивідуального захисту, перш за все для захисту органів дихання (фільтруючі і ізолюючі протигази, респіратори, захисні окуляри, спеціальний одяг).

### **5.4. Висновки до розділу**

Отже, встановлено, що в процесі виробництва пробіотичного препарату Симбітер утворюється значна кількість забрудненої води та повітря, що містить в собі мікроорганізми, органічні та мінеральні речовини. Досліджено, що забруднене повітря може викликати ряд захворювань, в тому числі і алергічні реакції, для запобігання яких необхідно використовувати ряд технічних та індивідуальних захистів.

Показано, що в наш час з перемінним успіхом застосовуються різні методи очищення забруднених стічних вод:

- самоочищення – пасивний метод, що не забезпечує швидкого та ефективного вирішення проблеми, адже воно відбувається протягом дуже довгого часу під дією природних фізичних і хімічних перетворень без участі людей та механізмів;

- механічні методи – передбачають ліквідацію забруднень за допомогою всіляких конструкцій та пристроїв. Цей метод потребує менш тривалого часу на очищення, але необхідні кошти на придбання та оснащення механізмів та не завжди забезпечує ефективне і повне очищення;

- фізико-хімічні методи – очистка полягає в тому, що в стічні води вводять речовину-реагент (коагулянт чи флокулянт). Вступаючи в хімічну реакцію з домішками, які знаходяться у воді, ця речовина сприяє повному видаленню нерозчинних домішок, колоїдів і частини розчинних з'єднань;

- біологічні методи – полягає в використанні біологічних культур. Розрізняють анаеробний і аеробний метод біологічної очистки. Для очищення стічних вод краще використовувати анаеробний метод. Перевагами цього методу є біологічне, екологічно чисте розкладання забруднювачів, не довгий час ліквідації забруднення, не великі економічні затрати, не відбувається перенавантаження навколишнього середовища забруднюючими речовинами, а головне – можливість одержання енергетично цінного біопалива.

Рекомендовано з метою профілактики негативного впливу бактерій на організм людини дотримуватись технічних, санітарно-технічних, лікувальних заходів та заходів індивідуального захисту працівників.

## ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано пробіотичні препарати та мікроорганізми, які входять до їх складу, показано, що пробіотики поділяються на 6 поколінь. Пробіотики VI – покоління – це більш досконалі і складні полікомпонентні продукти, отримані із застосуванням нових технологій і містять кілька видів бактерій і речовин, що сприяють їх росту.

2. Для виробничого біосинтезу пробіотичного препарату Симбітер підібрали більш оптимальне поживне середовище на основі молочної сироватки, яка містить багато поживних речовин, що значно покращує процес ферментації. Запропановано для підготовки посівного матеріалу використовувати поживне середовище на основі ячмінно-солодового екстракту.

3. Для культивування обирали ферментер в якому відбувається аерація, оскільки деякі з продуцентів є аеробами, тому потрібна система подавання повітря. Для основного процесу ферментації запропоновано ферментер марки Biorus 700 L Технічні характеристики: продуктивність – 150 кг/год, розміри: об'єм – 500 м<sup>3</sup>, висота – 4 м. потужність – 75 кВт, вага – 10000 кг, максимальна температура охолодження конденсатора – -75 °С.

4. Розробили технологічну схему для пробіотика Симбітер.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ

### ДЖЕРЕЛ

1. Анохина Г. А. Современные аспекты микроэкологического дисбаланса. Профилактика и лечение / Г. А. Анохина, С. В. Скопиченко // Журнал практичного лікаря. – 2001, № 4. – С. 20-24.
2. Аркадьева З. А. Промышленная микробиология / З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов. – К.: Высшая школа, 1989. – 688 с.
3. Беккер М. Е. Введение в биотехнологию; [Пер. с латыни]. – Рига: Пищевая промышленность, 1978. – 231 с.
4. Белоусова Е. А. Синдром диареи в практике гастроэнтеролога: патофизиология и дифференцированный подход к лечению / Е. А. Белоусова, А. Р. Златкина // Фарматека. – 2003. – № 10. – С. 65-71.
5. Беюп Е. А. Дисбактериозы кишечника и их клиническое значение / Е. А. Беюп, И. Б. Куваева // Клин. мед. – 1986. – С. 37-44.
6. Бережний В. В. Діагностика, сучасна фармакотерапія та профілактика кишкового дисбактеріозу у дітей: Метод. рекомендації / В. В. Бережний, Н. К. Уніч, І. Б. Орлюк. – К., 2000. – 36 с.
7. Бережной В. В. Микроэкологические нарушения у детей и современные возможности повышения эффективности их коррекции / В. В. Бережной, С. А. Крамарев, В. Ю. Мартынюк. Э. Э. Шунько // Здоровье женщины. – 2002, № 4 (12). – С. 79-91.
8. Биологическая роль бактерий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mikrobio.ho.ua/mikro-text12.html>
9. Бондаренко В. М. Микроэкологические изменения кишечника и их коррекция с помощью лечебно-профилактических препаратов / В. М. Бондаренко, Н. М. Грачева, Т. В. Мацулевич, А. А. Воробьев // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии. – 2003. – Приложение № 20. – С. 66-76.
10. Борщ С. К. Диференційоване використання пробіотиків для антагоністичного впливу на грампозитивні бактерії у лікуванні кишкових інфекцій і



синдрому дисбактеріозу кишечника / С. К. Борщ // Ліки України. – 2008. – № 6. – С. 69-74.

11. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.

12. Грачева Н. М. Эффективность лечения острых кишечных инфекций, хронических болезней желудочно-кишечного тракта и вирусного гепатита В большими дозами отечественного бифидумбактерина форте / Н. М. Грачева, И. Т. Щербаков, А. А. Аваков, Т. М. Мацулевич // Военно-медицинский журнал. – 1999. – № 5. – С. 51-57.

13. Грачева Н. М. Пробиотики в комплексном лечении больных с заболеваниями ЖКТ с сопутствующим дисбактериозом кишечника / Н. М. Грачева, О. С. Партин, А. А. Аваков, А. Ф. Гаврилов, А. И. Соловьева // Лечащий врач. – 2008. – № 9. – 452 с.

14. Гусев М. В. Микробиология: учебник [для студ. биол. специальностей вузов] / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – [4-е изд., стер.]. – М. : Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.

15. Жидецкий В. Ц. Основи охорони праці : [підруч. для студ. вищ. навч. закл.] / В. Ц. Жидецкий. – Л.: Українська академія друкарства, 2006. – 336 с.

16. Захаров Л. Н. Техника безопасности в химических лабораториях / Л. Н. Захаров. – Л. : Химия, 1991. – 336 с.

17. Запруднов А. М. Микробная флора кишечника и пробиотики / А. М. Запруднов, Л. Н. Мазанкова // Методическое пособие. – К., 2001. – С. 32.

18. Каримов М. М. Пробиотики как компонент эрадикационной терапии язвенной болезни / М. М. Каримов, А. А. Якубов, З. З. Саатов // Гастросессия, 24-25 ноября 2011 года. – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 4. – С. 13.

19. Коршунов В. М. Проблема регуляции микрофлоры кишечника / В. М. Коршунов // Журн. микробиол. – 1995. – № 3. – С. 56.

20. Лазебник Л. Б. Использование пробиотиков при эрадикации *Helicobacter pylori* / Л. Б. Лазебник, М. Н. Рустамов // XII съезд Науч. общества гастроэнтерологов России «Классическая и прикладная гастроэнтерология». – тезисы докладов, 1-2 марта 2012 г. – К. – С.18-19.

21. МВК 10.10.2.2-119-2005. Методичні вказівки з методів контролю. Визначення кількості біфідобактерій у кисломолочних продуктах. – Київ, 2005. – 20с.
22. Мельникова И. Ю. Клинические исследования терапевтической и профилактической эффективности пробиотика Витафлор производства ГосНИИ особо чистых биопрепаратов Минздрава РФ. Отчет // ГОУ ДПО МАПО. Санкт-Петербург, 2004 г. – С. 37.
23. Можина Т. Л. Роль и место пробиотических препаратов в современной медицине (по материалам руководства Probiotics and prebiotics, 2008) / Т. Л. Можина // Суч. гастроентерол. – 2009. – № 1. – С. 5–13.
24. Основи охорони праці / [Ткачук К. Н., Халімовський М. О., Запарний В. В. та ін.]; під ред. Ткачука К.Н. та Халімовського М.О. – [2-ге вид., допов. та перероб.] – К.: Основа, 2006. – 448 с.
25. Пат. 38748 Україна. Тверде поживне середовище «ПСБ» для культивування біфідобактерій / П. А. Руденко, А. А. Руденко, С. С. Бордюгова, О. В. Комаров. – Заявл. 10.04.2008; Опубл. 12.01.2009. – Бюл. № 1. – с. 82.
26. Пат. 83027 Україна. Штам *Bifidobacterium bifidum*, композиція, що містить галактоолігосахариди, її застосування та спосіб виробництва речовини для стимулювання росту біфідобактерій / У. Е. Грехем, Г. Гленн, С. Я. Вітольд, Ц. Георгіос. – Заявл. 16.03.2004; Опубл. 10.06.2008. – Бюл. № 11. – 11 с.
27. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : Підручник / Т. П. Пирог – Київ : НУХТ, 2004. – 471 с.
28. Пономарев С. В. Новая тактика в лечении больных с острыми кишечными инфекциями / С. В. Пономарев, Е. Н. Кубенский // Поликлиника. – 2003. – № 3. – С. 35.
29. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю: ДСП 9.9.5.-080-2002. – Офіц.вид. – К.: ГРІФРЕ: М-во охорони здоров'я України, 2002. – 33 с.
30. Прищеп Т. П. Основи фармацевтичної біотехнології / Т. П. Прищеп, В. С. Чучалін, К. Л. Зайков. – Ростов-на-Дону, 2006. – 256 с.

31. Промышленная биотехнология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» / З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина и др.; Под ред. Н. С. Егорова. – К. : Высш. шк., 1989. – 688 с.
32. Рогов И. А. Биотехнология / И. А. Рогов, В. И. Ганина, М. М. Данилова. – 2003. – № 4. – С. 45-51.
33. Сидорук К. В. Универсальный метод выделения высокомолекулярной ДНК из микроорганизмов, основанный на предварительной обработке биомассы раствором ацетата аммония / К. В. Сидорук, Е. И. Левитин, О. В. Пикасова // Актуальные вопросы генетики, радиобиологии и радиэкологии: Вторые чтения, посвящённые памяти В.И. Корогодина и В.А. Шевченко (Дубна – Москва, 12-13 января 2009 г.): Материалы, тезисы докладов. – Дубна: ОИЯИ, 2008. – С. 100.
34. Смирнов В. В. Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты / В. В. Смирнов // Лікування та діагностика. – 2001. – № 3. – С. 8-16.
35. Смирнов В. В. Дискуссионные вопросы создания и применения бактериальных препаратов для коррекции микрофлоры теплокровных / В. В. Смирнов, С. Р. Резник, И. Б. Сорокулова, В. А. Вьюницкая // Микробиол. журн. – 1992. – Т 54, №6. – С. 82–94.
36. Тропко Л. В. Сравнение бактериологической эффективности различных пробиотиков в комплексном лечении больных неспецифическим язвенным колитом / Л. В. Тропко. // Вісник Дніпропетровського університету. – Серія Біологія. Екологія. – Вип. 7. – 2000. – С. 270–273.
37. Хавинсон В. Х. Свободнорадикальное окисление и старение / В. Х. Хавинсон, В. А. Баринев, А. В. Арутюнян, В. В.Малинин – СПб., 2003. – 327 с.
38. Феклисова Л. В. Пробиотики в лечении детей с хронической гастроэнтерологической патологией / Л. В. Феклисова, С. В. Полевой, А. Ю. Ушакова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2002. – № 4. – С. 42-45.
39. Шендеров Б. А. / В кн.: Медицинская и микробная экология и функциональное питание. – К.: Грант, 2001. – Т. 3. – С. 42-74.
40. Ghisolfi J. Dietary fibre and prebiotics in infant formulas. – Proc Nutr Soc. 2003. – № 62. – P.183

41. Pिकासова O. V. Methods of Molecular Identification as Important Tools for Control and Certification in Microbiology / O. V. Pिकासова, M. A. Kornienko, Yu. D. Tsygankov, A. I. Netrusov // *Electronic Journal of Natural Sciences*, Jan 2009. – Vol. 2009. – Issue 1. – P. 35-49.
42. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
43. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 359 с.
44. Перспективы и пути развития производства биотехнологических лекарственных препаратов в Украине / Л. С. Стрельников, О. П. Стрилец, О. В. Щербак, В. В. Чикиткина, Т. А. Долгова // *Annals of Mechnicov Institute*. – 2006. – №4. – С. 3-8.
45. Дисбиозы и современные подходы к их профилактике / Д. С. Янковский, В. П. Ширококов, Р. А. Моисеенко, А. П. Волосовец, С. П. Кривопустов, Г. С. Дымент // *Современная педиатрия*. – 2010. – № 3 (31). – С. 143-151.
46. Розробка складу та технології таблеток-ядер комбінованого пробіотика / П. А. Гордієнко, В. І. Чуєшов, Р. О. Пашнєва // *Фармаком*. – 2009. – № 3. – С. 19-23.
47. Янковский Д. С. Особенности отечественных мультипробиотиков / Д. С. Янковский, Р. А. Моисеенко, Г. С. Дымент // *Современная педиатрия*. – 2009. – №3(25). – С. 79-86.
48. Феклисова Л. В. Применение новых синбиотиков в педиатрической практике / Л. В. Феклисова // *Лечащий врач*. – 2011. – № 9. – С. 24-28
49. Голуб Б. О. Способи стабілізації пробіотичних культур та поліпшення поживних властивостей синбіотичних продуктів / Б. О. Голуб // *Вісник Донецького Національного університету*. – 2009. – № 1(41). – С.130-134.
50. Candela M. Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design / M. Candela, S. Maccaferri, S. Turrone // *International journal of food microbiology*. – 2010. – 140 (2). – P. 93 – 101.
51. Микробная экологическая система человека и использование отечественных мультипробиотиков для профилактики и устранения ее нарушений у

детей / Е. М. Лукьянова, Ю. Г. Антипкин, Д. С. Янковский, Р. А. Моисеенко, Г. С. Дымент // *Соврем. педиатрия*. – 2009. – № 4 (26). – С.117 -128.

52. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea / F. Cremonini, S. Di Caro, E. C. Nista, F. Bartolozzi, G. Capelli, G. Gasbarrini, A. Gasbarrini // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 2002. – № 16 (8). – P.1467

53. The aging gut microbiota: new perspectives / E. Biagi, M. Candela, C. Franceschi, P. Brigidi // *Ageing research reviews*. – 2011. – 10 (4). – P. 428-429.

54. Микрофлора полости рта, дисбактериоз и пути его коррекции пробиотиками / И. И. Соколова, К. В. Скидан, Л. В. Воропаева, Т. В. Томилина [и др.] // *Экспериментальная і клінічна медицина*. – 2010. – № 2. – С. 64-69.

55. Боровский Е. В. Биология полости рта / Е. В. Боровский, В. К. Леонтьев. – М.: Мед. книга, Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2001. – 304 с.

56. Грудянов А. И. Применение пробиотиков в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / А. И. Грудянов, Н. А. Дмитриева, Е. В. Фоменко. – М.: Мед. информ. агентство, 2006. – 112 с.

57. Імунобіологічні препарати / В. В. Смірнов, О. П. Сельнікова, В. Д. Думанский [ та ін. ] – К.: Моріон, 2001. – 200 с.

58. Малов В. А. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: современное состояние проблемы / В. А. Малов, Н. М. Гюлазян // *Лечащий врач*. – 2006. – № 7. – С. 77-83.

59. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles / V. Vitali, M. Ndagijimana, F. Cruciani, P. Carnevali // *BMC microbiology*. – 2010. – 10 (1). – P. 1471-1484.

60. Экспериментальная оценка лимфоцитотоксического действия бифидобактерий и лактобактерий / А. С. Ердякова, И. Ю. Чичерин, И. А. Лундовских, И. П. Погорельский // *Практическая медицина*. – 2012. – № 3. – С. 194-196.

61. Янковский Д. С. Современное состояние проблемы получения и клинического применения пробиотиков / Д. С. Янковский, Г. С. Дымент // *Совр. педиатрия*. – 2007. – № 2 (15). – С. 136-146.

ДОДАТОК А

Технологічна схема отримання пробіотичного препарату Симбітер