

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

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

_____ М.М. Барановський

«__»_____2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА
(ПОЯСНОВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «МАГІСТР»

ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

Тема: Удосконалення технології біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii*
для виробництва пробіотика «Нормагут»

Виконавець: студентка групи ФБ-205м ФЕБІТ

Шпетна К.О.

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

Решетняк Л.Р.

Консультант з розділу «Охорона праці»:

Павлиш В.Д.

Консультант з розділу «Охорона навколишнього
середовища»:

Рябчевський О.В.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ М.М.Барановський

«___» _____ 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Шпетної Крістини Олексіївни

1. Тема дипломної роботи: «Удосконалення технології біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва пробіотики «Нормагут»» затверджена наказом ректора від «15» вересня 2020 р. № 1657/ст.
2. Термін виконання роботи: з 5 жовтня по 23 грудня 2020 р.
3. Вихідні дані роботи: літературні джерела щодо технології біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii*; пробіотики, дріжджі *Saccharomyces boulardii* – біологічний агент, процес біосинтезу, поживне середовище, лікарський препарат «Нормагут».
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ, ДОДАТКИ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 92 с., 18 рис., 2 табл., 52 літературних джерела, 2 додатки.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання
1	Вибір теми дипломної роботи, узгодження змісту з дипломним керівником.	26.09.20-30.09.20
2	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи: «Удосконалення технології біосинтезу дріжджів <i>Saccharomyces boulardii</i> для виробництва пробіотику «Нормагут»».	01.10.20-09.10.20
3	Складання схеми виконання магістерської дипломної роботи.	10.10.20-14.10.20
4	Ознайомлення з методикою постановки експерименту на базі проходження переддипломної практики.	15.10.20-21.10.20
5	Проведення експерименту на базі проходження переддипломної практики.	22.10.20-12.11.20
6	Аналіз та обробка отриманих даних.	13.11.20-18.11.20
7	Оформлення практичної частини дипломної роботи на основі отриманих результатів.	19.11.20-04.12.20
8	Формулювання висновків та рекомендацій.	05.12.20-06.12.20
9	Перевірка дипломної роботи керівником.	06.12.20-08.12.20
10	Попередній захист дипломної роботи.	10.12.20
11	Захист дипломної роботи.	23.12.20

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	Рябчевський О.В.		

8. Дата видачі завдання: «__»_____2020 р.

Керівник дипломної роботи _____ /Решетняк Л.Р./
(підпис керівника)

Завдання прийняла до виконання _____ /Шпетна К.О./
(підпис випускника)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Удосконалення технології біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва пробіотика «Нормагут»»: 92 с., 18 рис., 2 табл., 52 використаних джерела, 2 додатки.

Мета дипломної роботи – удосконалити технологію біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва пробіотика «Нормагут».

Об'єкт дослідження – процес отримання дріжджів *Saccharomyces boulardii*.

Предмет дослідження – лікарський препарат «Нормагут».

Методи дослідження – мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, математичні.

Удосконалено технологію біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва пробіотика «Нормагут», що дозволяє скоротити час накопичення біомаси дріжджів та збільшити у 2 рази її кількість.

Встановлено, що для накопичення біомаси дріжджів доцільно використовувати синтетичне поживне середовище Рідера з додаванням в якості джерела неорганічного азоту – сечовини, що володіє високими ростовими властивостями. Відповідно, це поживне середовище є актуальним, перспективним і дешевим для збільшення виходу дріжджів. Матеріали дипломної роботи можуть бути використані при викладанні дисциплін за спеціальністю 162 «Біотехнологія та біоінженерія».

БІОТЕХНОЛОГІЯ, ПРОБІОТИКИ, ДРІЖДЖІ, SACCHAROMYCES BOULARDII, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ДЖЕРЕЛО НЕОРГАНІЧНОГО АЗОТУ

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	12
1.1. Загальна характеристика пробіотиків на основі дріжджів <i>Saccharomyces boulardii</i>	12
1.1.1. Пробиотики та їх властивості.....	15
1.1.2. Форми випуску пробіотичних препаратів.....	20
1.1.3. Безпечність і побічні ефекти пробіотичних препаратів.....	22
1.1.4. Вимоги, що пред'являються до пробіотичних препаратів.....	24
1.2. Характеристика та класифікація дріжджів <i>Saccharomyces boulardii</i>	26
1.2.1. Систематика дріжджів роду <i>Saccharomyces</i>	27
1.2.2. Морфологічні та фізіологічні ознаки дріжджів <i>S.boulardii</i>	29
1.2.3. Терапевтичні властивості та механізм дії дріжджів <i>S.boulardii</i>	33
1.3. Висновки до розділу.....	38
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	40
2.1. Об'єкти досліджень.....	41
2.1.1. Характеристика лікарського препарату «Нормагут».....	41
2.1.2. Характеристика дріжджів <i>S.boulardii</i>	42
2.1.3. Поживне середовище та умови субкультивування дріжджів <i>S.boulardii</i>	42
2.1.4. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера для вирощування дріжджів <i>S.boulardii</i>	45
2.2. Методи досліджень.....	48
2.2.1. Виділення чистої культури дріжджів <i>S.boulardii</i> з лікарського препарату «Нормагут» методом граничних розведень.....	48
2.2.2. Визначення біомаси дріжджів <i>S.boulardii</i>	52
2.2.3. Визначення мертвих та зрілих клітин дріжджів <i>S.boulardii</i>	54
2.3. Висновки до розділу.....	55

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
3.1. Отримання чистої культури дріжджів <i>S.boulardii</i> з лікарського препарату «Нормагут».....	56
3.2. Розрахунок мертвих та зрілих клітин дріжджів <i>S.boulardii</i>	57
3.3. Порівняння ефективності біосинтезу дріжджів <i>S.boulardii</i> при додавання різних джерел неорганічного азоту.....	57
3.4. Підбір збалансованого поживного середовища для вирощування дріжджів <i>S.boulardii</i>	59
3.5. Удосконалення технології отримання пробіотика «Нормагут».....	61
3.6. Висновки до розділу.....	63
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	64
4.1. Аналіз потенційно небезпечних та шкідливих виробничих факторів в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут».....	64
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних або шкідливих виробничих факторів в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут».....	66
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут».....	70
4.4. Висновки до розділу.....	73
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	74
5.1. Характеристика осадів стічних вод, як джерела екологічної небезпеки при дріжджовому виробництві.....	74
5.2. Поводження з осадами стічних вод при виробництві пробіотика «Нормагут».....	77
5.3. Методи очистки стічних вод при виробництві пробіотика «Нормагут».....	79
5.4. Висновки до розділу.....	83
ВИСНОВКИ.....	85
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	86
ДОДАТОК А.....	91
ДОДАТОК Б.....	92

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІ

S.boulardii – *Saccharomyces boulardii*;

УФ – ультрафіолет;

БТ – біотехнологія;

ШКТ – шлунково-кишковий тракт;

МС – метиленовий синій;

КУО – колонієутворююча одиниця;

Ig – імуноглобулін;

ВГО – Всесвітня гастроентерологічна організація,

БАР – біологічно активні речовини;

АНД – аналітична нормативна документація;

GMP – належна виробнича практика;

ОС – осади стічні;

ОСВ – осади стічних вод.

ВСТУП

Актуальність теми. Практичне застосування дріжджів викликає великий інтерес завдяки ряду їх унікальних властивостей. Дріжджі роду *Saccharomyces* служать людині протягом тисячоліть. Дріжджі все ширше використовують для отримання фармацевтичних препаратів, зростає інтерес до їх антимікробних і пробіотичних властивостей.

Згідно з визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я, пробіотики – це живі мікроорганізми, які при вживанні в адекватних кількостях приносять користь для здоров'я людини. Сучасними продуцентами для пробіотиків є бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus*, а також дріжджі роду *Saccharomyces* [1].

Серед пробіотиків, біологічним агентом яких є дріжджі, важливе місце займає лікарський засіб – «Нормагут». Галузь фармацевтики пропонує більше десятків тисяч препаратів у складі яких діючою речовиною виступають дріжджі.

З економічної та екологічної точок зору дріжджі є продуцентами біологічно активних речовин (БАР). Їх перевага полягає перш за все, в «технологічності», оскільки дріжджі без особливих складнощів можна культивувати в промислових умовах. Дріжджі характеризуються високою швидкістю росту, стійкістю до контамінуючої мікрофлори, легко відокремлюються від культуральної рідини, не забруднюють повітря спорами.

Клітини дріжджів містять до 25% сухих речовин. Найбільш цінний компонент дріжджової біомаси – білок, який за складом амінокислот перевершує білок зерна злакових культур і незначною мірою поступається білкам молока і рибного борошна. Біологічна цінність дріжджового білка визначається наявністю значної кількості незамінних амінокислот. Крім того, дріжджові клітини містять мікроелементи і значну кількість жиру, в якому переважають ненасичені жирні кислоти.

Застосування дріжджів в медицині засноване на явищі антагонізму дріжджів і патогенних мікроорганізмів, яке пов'язане з конкуренцією за поживні речовини,

зміною рН середовища, утворенням етанолу і антимікробних сполук, включаючи бактеріоцини і мікоцини. Мікоцини – позаклітинні білки або глікопротеїни, які порушують функцію клітинної мембрани у грибних клітинах. До утворення мікоцинів здатні представники багатьох дріжджових родів, включаючи *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* і *Zygosaccharomyces*. Механізмом дії мікоцинів є блокування синтезу ДНК, інгібування синтезу компонента клітинної стінки β -1,3-глюкана і порушення іонного обміну, викликаного утворенням каналів на мембрані цитоплазми. Крім того, дріжджі є джерелами вітамінів, амінокислот, мікроелементів і ферментів, що стимулюють розвиток нормальної мікрофлори кишківника. Глюкани, манани і хітин клітинної стінки дріжджів позитивно впливають на явища спільної агрегації і когезії, які відіграють важливу роль у виживанні корисних мікроорганізмів. Все це дозволяє розглядати дріжджі як перспективні продуценти та для виробництва пробіотиків [2].

Робіт з використанням дріжджів *S.boulardii* ще недостатньо, тому тема дипломної роботи є актуальною та перспективною.

Мета роботи – удосконалити технологію біосинтезу дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва пробіотика «Нормагут».

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання**:

1. Охарактеризувати властивості пробіотичного препарату «Нормагут» та його значення, як лікарського засобу.

2. Дослідити морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості дріжджів *S.boulardii*, як біологічного агента.

3. Підібрати обладнання для біосинтезу дріжджів *S.boulardii*.

4. Провести пошук збалансованого та економічно вигідного за складом поживного середовища для інтенсивного накопичення біомаси дріжджів *S.boulardii*.

Об'єкт дослідження – процес отримання дріжджів *Saccharomyces boulardii*.

Предмет дослідження – лікарський препарат «Нормагут».

Методи дослідження – мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, математичні.

Практичне значення отриманих результатів. Матеріали дипломної роботи можуть бути використані при викладанні дисциплін за спеціальністю 162 «Біотехнологія та біоінженерія».

Особистий внесок випускника. Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, обробка результатів, їх опис, аналіз виконані випускником особисто під керівництвом к.т.н., доцента кафедри біотехнології ФЕБІТ НАУ Решетняк Л.Р. на базі кафедри біотехнології НАУ.

Апробація отриманих результатів. Матеріали дипломної роботи були представлені на: IV Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 15-річчю кафедри біотехнології НАУ; IX Всесвітньому конгресі «Авіація в ХХІ ст.» – «Безпека в авіації та космічні технології». За матеріалами дипломної роботи опубліковано 2 наукові роботи:

1. Шпетна К.О. Використання дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва інноваційних лікарських засобів в Україні / К.О. Шпетна, Л.Р. Решетняк // IV Міжн. наук.-практ. конф., присвячена 15-річчю кафедри біотехнології НАУ, (23 вересня 2020 р., м.Київ) – К.: НАУ, 2020.

2. Шпетна К.О. Дріжджі *Saccharomyces boulardii* – ефективний продуцент при виробництві пробіотиків / К.О. Шпетна, Л.Р. Решетняк // IX Всесвітній конгрес «Авіація в ХХІ ст.» – «Безпека в авіації та космічні технології», (22 вересня 2020р., м.Київ) – К.: НАУ, 2020.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Загальна характеристика пробіотиків на основі дріжджів *Saccharomyces boulardii*

Протягом останніх років з'явився ряд робіт, присвячених застосуванню дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва пробіотичних препаратів. Ці дріжджі мають широкий спектр перспектив застосування в медицині [3-6].

Їх відмінністю від більшості бактеріальних пробіотичних препаратів є резистентність до кислого середовища шлунка, вони не руйнуються під впливом шлункового соку і в цілісному стані потрапляють в кишківник.

Існує ряд пробіотиків на основі дріжджів *S.boulardii*, що підтримують і поновлюють кишковий мікробіом. Доведено, що дріжджі *S.boulardii* знімають симптоми гострої діареї у дітей, знижують ризик виникнення різних видів діареї у дорослих, запобігають реінфекції *Clostridium difficile*, знижують частоту скорочень мускулатури кишківника у хворих на синдром подразненого кишківника.

Протидіарейні ліки з діючою речовиною дріжджів *S.bulardii* зареєстровані у США. Препарат продається під торговим найменуванням «Florastor».



Рис. 1.1. Протидіарейні ліки «Florastor» з діючою речовиною *S.boulevardii*

У європейських країнах і США продаються харчові добавки, що містять пробіотичні штами дріжджів *S.boulevardii* і позиціонуються як протидіарейні засоби: «DiarSafe», «Ultra Levure», «OptiBac».



Рис. 1.2. Харчова добавка-пробіотик «OptiBac», що містить дріжджі *S.boulevardii*

У ліофілізованому вигляді дріжджі *S.boulevardii* застосовуються як активні речовини в протидіарейних, антимікробних лікарських препаратах.



Рис. 1.3. «Ентерол» – ліки, що містять у своєму складі дріжджі *S.boulevardii*

Аналізуючи останні напрацювання науковців у сферах мікробіології та медицини, вчення про кишковий мікробіом і його значення у забезпеченні здоров'я людини, можна вважати головним досягненням медичної науки ХХ-ХХІ ст [7]. Якщо на початку дослідницького шляху вчені зосереджували увагу на загальних характеристиках мікробіому кишківника в нормі та при патології, можливостях різних пробіотиків при тих чи інших захворюваннях, то сьогодні акцент роблять не лише на ефективності, а й на безпечності окремих штамів мікроорганізмів [7].

Згідно з сучасним визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я, пробіотики – це живі мікроорганізми, які у разі їх призначення в адекватних кількостях зумовлюють позитивний вплив на макроорганізм. Важливо наголосити на тому, що пробіотиком може називатися лише той продукт, котрий містить достатню кількість мікроорганізмів (від 2×10^7 до $3,2 \times 10^{12}$ колонієутворювальних одиниць (КУО) у дозі). Ефективність пробіотика має бути підтверджена результатами клінічних досліджень [7].

Сьогодні фармацевтичний ринок переповнений засобами, які позиціонуються як пробіотики. Проте накопичені більше ніж за 100 років дані демонструють, що не всі пробіотики є корисними та безпечними. Сучасний пробіотик має відповідати таким вимогам: чинити позитивну дію на організм людини, не викликати побічних ефектів при тривалому застосуванні, зберігати свої властивості в шлунково-кишковому тракті, володіти клінічною ефективністю та мати просту технологію виробництва [7].

Найбільш вивченим біологічним агентом є *S. boulardii* – вид непатогенних одноклітинних дріжджів роду *Saccharomyces*. В Україні пробіотик у якому діючою речовиною є дріжджі *S. boulardii* відомий під комерційною назвою «Нормагут» (виробник – «Ардейфарм ГмбХ», Німеччина). Незважаючи на те, що дріжджі не є типовими представниками мікрофлори кишківника людини, вони сприяють нормалізації мікробіому, володіють прямим антагонізмом до низки патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [7].



Рис. 1.4. Пробіотик «Нормагут» з діючою речовиною *S.boulardii*

Пробіотик «Нормагут» також забезпечує антитоксичний, антисекреторний, трофічний ефекти, проявляє ферментативну активність, покращує неспецифічний імунний захист. Після прийому пробіотика максимальна його концентрація у кишківнику досягається на 3-тю добу, а через 2-5 днів після припинення вживання пробіотик повністю елімінується з організму [7].

Пробіотики – це група засобів, які викликають значний інтерес у науковців та активно досліджуються у всьому світі. Рекомендації авторитетних міжнародних організацій, результати клінічних досліджень і метааналізів підтверджують ефективність лише обмеженого переліку пробіотичних штамів у лікуванні деяких захворювань у людей.

Таким чином, пробіотики з діючою речовиною дріжджів *S. boulardii* зменшують тривалість діареї та термін госпіталізації людей із гострими захворюваннями шлунково-кишкового тракту [8].

1.1.1. Пробіотики та їх властивості

Протягом ряду років існувало декілька трактувань терміну «пробіотик». Уперше використали цей термін для позначення метаболітів, що продукують одні мікроорганізми для стимуляції росту інших [9]. Фулер трактує поняття «пробіотики» як живі мікроорганізми, що при введенні в організм хазяїна спричиняють позитивний ефект за рахунок корекції кишкової мікрофлори. Паркер термін «пробіотики» запропонував для позначення природних ад'ювантів – живих мікроорганізмів, уведення яких до організму сприяє підтриманню та відновленню біологічного балансу його нормофлори [9, 10]. Гібсон і Робефрід [8] називають пробіотиками живі мікроорганізми, що повинні бути присутніми у досить великій кількості, залишатися стабільними та життєздатними як при збереженні, так і після введення до організму; повинні адаптуватися в організмі хазяїна та впливати на його здоров'я.

Незважаючи на різноманітні формулювання поняття «пробіотики», більшість дослідників називають ним лікарські засоби, що містять як діючу речовину певні штами мікрофлори здорового організму людини. Відомо, що мікроорганізми, які у

нормі заселяють слизові оболонки чинять антагоністичну дію відносно патогенної й умовно-патогенної мікрофлори, забезпечують синтез вітамінів та ферментів [11].

При створенні пробіотичних препаратів відбирають штами мікроорганізмів, що відповідають визначеним вимогам:

- безпека штамів, призначених для введення їх до складу пробіотиків;
- наявність антагоністичних властивостей до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори;
- стійкість до літичних ферментів слини (лізоцим), травних ферментів (пепсин, ліпаза) і до жовчі;
- стійкість до дії кислоти шлункового соку;
- адгезивна активність і колонізація на резистентність;
- стійкість до антибіотиків;
- питома швидкість росту пробіотичних культур висока, що дозволяє їм швидше освоїти поживний субстрат, а отже, збільшити продуктивність клітин;
- штам повинен бути технологічним при виробництві (стабільним при культивуванні та на інших стадіях технологічного процесу);
- достатня імуномодуляторна та імуногенна дія пробіотика [12,13].

Пробіотики – біологічні препарати, що містять штами нормальної мікрофлори кишківника. Пробіотики можуть міститися в різних продуктах харчування, лікарських засобах, дієтичних добавках [13]. У кишківнику знаходяться від 400 до 600 різних видів мікроорганізмів, найбільш важливими з них є лактобактерії, біфідобактерії, кишкова паличка, як складові основи мікрофлори товстого кишківника. До цієї ж групи належать пропіоновокислі бактерії, ентерококи та ін. Видовий склад цих мікроорганізмів успадковується генетично, тому вони в кишківнику здорової людини знаходяться постійно. Надлишок або нестачу окремих представників нормальної мікрофлори називають дисбактеріозом.

Переваги пробіотиків по відношенню до інших препаратів, наступні: нешкідливість для організму людини навіть у концентраціях, які значно перевищують рекомендовані для застосування, а також здатність ряду штамів суттєво підвищувати неспецифічну резистентність макроорганізму.

Найважливішими властивостями деяких штамів спороутворювальних мікроорганізмів є їх антагоністична активність до багатьох патогенних і умовно патогенних бактерій; висока ферментативна активність, що дозволяє істотно регулювати і стимулювати травлення; протиалергенна і антитоксична дія і ряд інших.

На відміну від основної мікрофлори склад факультативної флори кишківника змінюється в залежності від дії тих чи інших факторів навколишнього середовища. Факультативна флора представлена умовно-патогенними мікроорганізмами: стафілококами, стрептококами, клостридіями, протеями, недосконалыми дріжджами. Рівновага мікроекологічної системи кишківника залежить від співвідношення різних представників мікрофлори [14].

До мікроорганізмів, що використовуються для виробництва пробіотиків, відносять: *Bacillus subtilis*; *Bifidobacterium adolesoentis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.longum*; *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L.delbrueckii subsp.bulgaricus*, *L.helveticus*, *L.fermentum*, *L.lactis*, *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces boulardii*, *S.cremoris*, *S.lactis*, *Sreptococcus salivarius subsp.thermophilus* та інші [15].

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

- регулює постійність мікробіоценозу і запобігає заселенню кишківника патогенними мікроорганізмами;
- сприяє процесам ферментативного перетравлення білків, ліпідів, високомолекулярних вуглеводів, нуклеїнових кислот, клітковини;
- бере участь у 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 та вітаміну D;

– підвищує імунну реакцію організму: стимулює лімфоїдний апарат, синтез імуноглобулінів, збільшує активність лізоциму, сприяє зниженню проникності 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, гострому перебігу хронічних захворювань. Для надання позитивного впливу пробіотиків на організм перш за все необхідно, щоб наявні в них представники нормальної мікрофлори прижилися і заселили кишківник.

Пробіотики повинні мати здатність до виживання і життєдіяльності в умовах кишкового мікрооточення і зберігати життєздатність бактерій протягом тривалого терміну. У сучасній літературі зустрічається кілька класифікацій препаратів пробіотиків. В основі більшості класифікацій лежить кількість вхідних в них видів мікроорганізмів, їх видова або родова приналежність, фізіологічні особливості мікроорганізмів, наявність додаткових компонентів, а також хронологія розвитку даної групи препаратів.

За кількістю видів мікроорганізмів, препарати-пробіотики поділяються на монокомпонентні, на монокомпонентні сорбовані пробіотики, полікомпонентні, комбіновані пробіотики (синбіотики). За видовою приналежністю компонентів – на біфідомісткі, лактомісткі, коліємісткі та ін.

На сьогоднішній день розглядаються кілька основних показань для призначення пробіотиків: дисбактеріози різної етіології, в тому числі, що виникли після проведення антибактеріальної терапії; вагінальна грибкова інфекція; інфекція сечового тракту; профілактика атеросклерозу і новоутворень кишківника [16].

Визнана також класифікація, в якій препарати, що нормалізують кишкову мікрофлору, поділяються на п'ять поколінь:

I покоління – монокомпонентні препарати. Містять один штам мікроорганізмів (біфідобактерій, лактобактерій, колібактерій, аерококів);

II покоління – антагоністи, що самостійно елімінуються з організму. Складаються зі спорових бацил та дріжджеподібних грибів;

III покоління – комбіновані препарати. Містять кілька штамів бактерій (полікомпонентні). Бактерії, що входять до його складу можуть відноситись до одного або різних видів та посилюють дію один одного;

IV покоління – синбіотики – комбінація пробіотичного і пребіотичного компонента [15];

V покоління – рекомбінантні або генно-інженерні пробіотики створені на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів та метаболітів, мають задані характеристики [16, 17].

На фармацевтичному ринку України пробіотики представлені доволі широко. Проведений аналіз асортименту лікарських засобів досліджуваної групи показав, що переважно це препарати, які містять дріжджі, біфідо-, колі- та лактобактерії (рис.1.5).

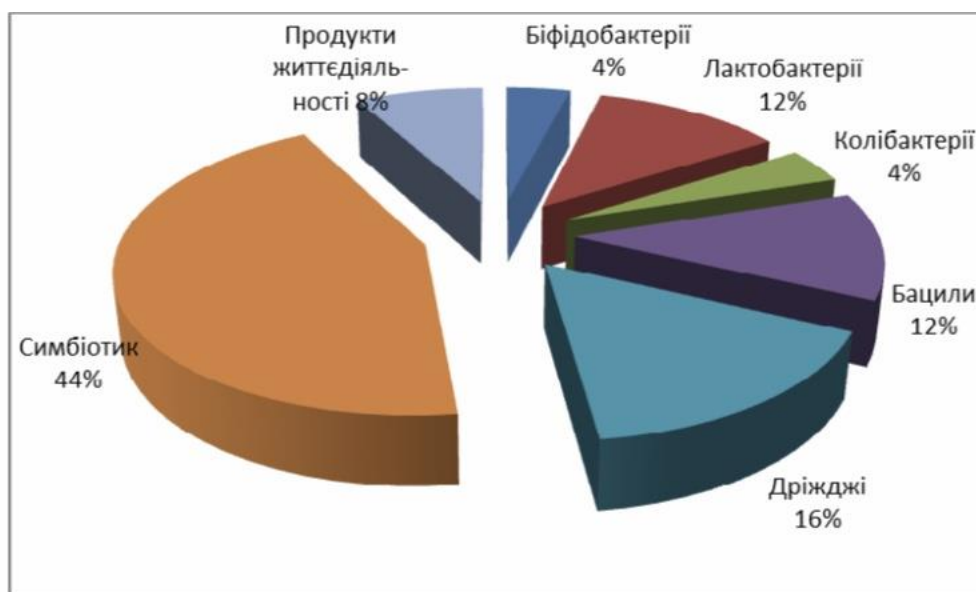


Рис. 1.5. Основа пробіотичних препаратів закордонних виробників

За даними рис.1.5. можна зробити висновок про перевагу та перспективність симбіотичних засобів та дріжджів в сегменті ринку пробіотиків.

На сьогодні широкому колу споживачів також доступні пробіотичні препарати біологічні добавки та їх кількість, зареєстрованих в Україні, постійно зростає. Разом

з тим, на українському ринку лікарських препаратів переважають імпортні пробіотики (рис.1.6).

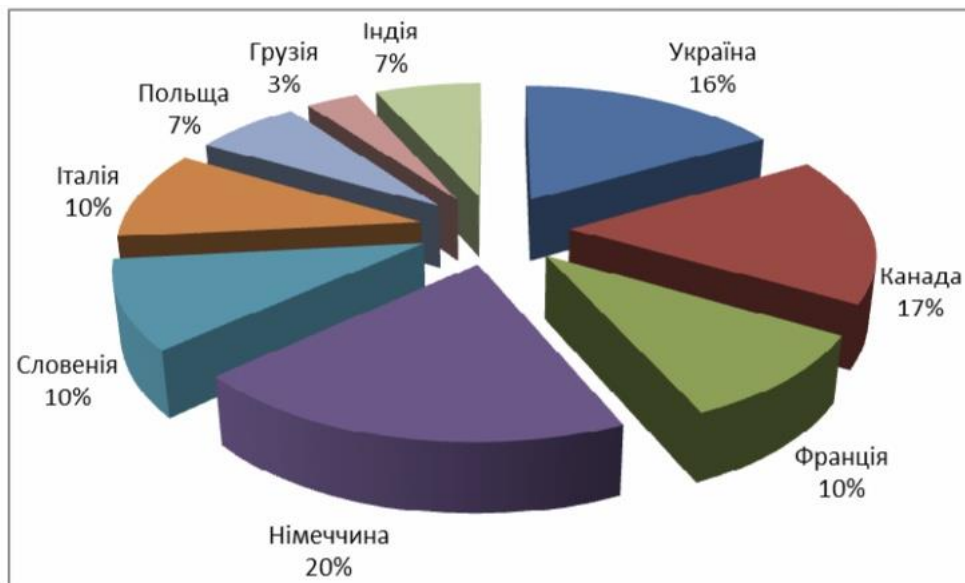


Рис. 1.6. Виробники пробіотичних лікарських препаратів, представлених на фармацевтичному ринку України

Як видно з рис.1.6, закордонні фірми займають біля 80 % українського фармацевтичного ринку в цій області. Станом на 1 січня 2018 року, до Державного реєстру лікарських засобів України включено 30 пробіотиків [18]. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: НВРУП «Діалек» (Білорусія), «Pharmachion» (Болгарія), «Ferrosan» (Данія), Institut Rosell Inc. (Канада), «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «Genom Biotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Франція), Mili Healthcare (Великобританія), «Merckle» (Німеччина). Українська фармацевтична лінія пробіотичних препаратів представлена виробниками: ДП «Ензим», «Артеріум», «Біофарма».

Отже, можна зробити висновок, що ринок пробіотичних препаратів є достатньою мірою структурованим сегментом загального фармацевтичного ринку України.

1.1.2. Форми випуску пробіотичних препаратів

За способом виробництва розрізняють рідкі та сухі бактеріальні препарати. Основне завдання технології виробництва бактеріальних препаратів на основі живих мікроорганізмів полягає в забезпеченні таких умов отримання і переробки мікробної маси, при яких в готовій продукції збереглося б максимальне число життєздатних клітин і не втрачалися б їх корисні властивості. Організація масового виробництва пробіотиків у вигляді порошків, таблеток, капсул, частково вирішує на сьогоднішній день одне з найважливіших завдань забезпечення практичної охорони здоров'я пробіотичними препаратами.

Перевагою сухих препаратів слід вважати те, що бактерії знаходяться в стані анабіозу. Тому вони не такі чутливі до перепадів температурного режиму, їх простіше зберігати. Більшість штамів мікроорганізмів при сушінні значно змінюють свою активність, перебуваючи в глибокому анабіозі та відновлюють її тільки лише після 3-5 пасажів у сприятливому для розмноження поживному середовищі. 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 кишківника. Для того, щоб хоч якась частина мікроорганізмів закріпилася в кишківнику, їх концентрація в сухих препаратах повинна бути не менше, ніж 10^{10} - 10^{12} живих бактерій в 1 грамі сухого порошку. Таку високу концентрацію живих мікроорганізмів отримати в умовах розпилювальної сушки або ліофілізації практично неможливо, тому що 10-25% популяції мікроорганізмів гине при цьому процесі.

Мікроорганізми, які зберегли життєздатність, різко знижують свою проліферативну активність, в результаті чого основна частина пробіотиків при їх призначенні проходить через кишківник 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 настільки дороге, що не кожне підприємство може його закупити [19].

Головна перевага рідких пробіотиків полягає в тому, що мікроорганізми в них знаходяться в біологічно активній формі і здатні до колонізації вже через 2 години після потрапляння в організм [19]. Свій сприятливий вплив вони надають досить

швидко після прийому препарату, що вигідно відрізняє рідкі пробіотики від аналогічних сухих препаратів.

Крім живих мікроорганізмів, рідкі пробіотики містять продукти їх життєдіяльності – 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 підбраному поживному середовищі, а також в кишківнику людини.

Рідкі пробіотики завдяки своїм унікальним лікувальним, профілактичним, загальнозміцнюючим діям охоплюють практично всі галузі медицини [19]. Тривала апробація в провідних клініках в багатьох регіонах України показала високу ефективність їх застосування в гастроентерології, проктології, гінекології, педіатрії, хірургії, травматології, дерматовенерології, онкології, в спортивній медицині, косметології та інших областях.

Рідкі пробіотики однаково корисні і безпечні для дорослих і дітей. Рідкі пробіотики набагато дешевше сухих препаратів, що пояснюється відповідними технологіями культивування і відсутністю стадії сушіння. Комплексне використання рідких пробіотиків дає можливість більш результативно стабілізувати мікрофлору кишківника, обмін речовин і зміцнити імунітет [18].

1.1.3. Безпечність і побічні ефекти пробіотичних препаратів

На відміну від багатьох інших лікарських засобів пробіотичні препарати продають без обов'язкового надання рецепту, тому до цієї групи медикаментів висувають високі вимоги щодо безпеки. В опублікованому документі «Пробіотики і пребіотики» [20] експерти висувають кілька постулатів щодо безпечності пробіотиків, а саме:

1. Деякі штами лакто- і біфідобактерій, що входять до складу пробіотичних препаратів, є представниками нормальної мікрофлори кишківника або проходять

крізь травний канал людини транзитом, не маючи інвазивної здатності або токсичності;

2. Молочнокислі бактерії, які традиційно використовують у виробництвах пробіотиків є абсолютно безпечними для перорального вживання в якості харчових добавок у здорових осіб;

3. Склад пробіотичних препаратів (концентрація мікробних клітин, зміст баластних речовин) варіюється в залежності від фірми виробника. Ефективність і побічні ефекти одного і того ж пробіотика, випущеного різними виробниками відрізняються в залежності від використовуваного штаму продуцента. Є висока ймовірність того, що генеричні препарати, які не підтвердили своєї ефективності в ході клінічних досліджень, будуть мати зовсім інший рівень ефективності та безпеки;

4. Слід враховувати відсутність даних про безпеку тривалого прийому пробіотичних препаратів, так як більшість із них використовують короткочасно;

5. Можливість призначення тяжкохворим пацієнтам препаратів, що містять ізоляти мікроорганізмів, які знаходяться в тонкій кишці, проведена в невеликій кількості клінічних досліджень. Тяжкохворим пацієнтам можуть бути рекомендовані тільки ті пробіотики, які довели свою ефективність і безпеку у подібної категорії хворих. Використання відомих пробіотиків без доказової бази або тестування нових препаратів у тяжкохворих пацієнтів можливо тільки після схвалення незалежних етичних комітетів [21].

Існують дані, що застосування пробіотичних препаратів може супроводжуватися появою непередбачених побічних ефектів, таких як розвиток інτερкурентних захворювань внаслідок впливу токсинів, що виробляються пробіотиками, або, що відзначається набагато рідше, виникненням інфекційного захворювання, викликаного самим мікроорганізмом. У зв'язку з цим експерти Всесвітньої гастроентерологічної організації (ВГО) підкреслюють, що одним з актуальних питань сучасної науки є вивчення патологічних, генетичних, токсикологічних, імунологічних, мікробіологічних аспектів застосування пробіотичних препаратів з метою остаточного уточнення всіх можливих побічних ефектів пробіотикотерапії.

Одним з віддалених наслідків терапії використання пробіотичних препаратів, якому до недавнього часу приділялося мало уваги, є поширення генів антибіотикорезистентності серед патогенних мікроорганізмів. Активне вивчення цього питання почалося після появи пробіотика на фармацевтичному ринку, що містить антибіотикорезистентні штами *Bacillus clausii*. Було висунуто припущення, що широке клінічне застосування цього препарату може призвести до поширення гена антибіотикорезистентності серед патогенних мікроорганізмів [21].

1.1.4. Вимоги, що пред'являються до пробіотичних препаратів

На сьогоднішній день немає чіткого юридичного визначення терміну «пробіотичний препарат», тому склад, форма випуску, терміни придатності пробіотиків встановлюють фірми-виробники самостійно, вони можуть значно варіюватися в залежності від стандартів виробника. Експерти ВГО підкреслюють, що мінімальні критерії, яким повинні відповідати лікарські засоби, що претендують на назву «пробіотичний препарат», мають бути наступними:

- мікроорганізми, що входять до складу препарату, повинні бути живими;
- вміст мікроорганізмів у препараті повинен знаходитися приблизно в однаковій концентрації протягом усього терміну придатності, мінімально варіювати в різних партіях препарату;
- препарат має підтвердити ефективність і безпеку в клінічних дослідженнях у людей.

У практичному керівництві «Пробіотики і пребіотики» [20] зазначено, що будь-який пробіотичний препарат може бути представлений на фармакологічний ринок тільки за умови підтвердження специфічності і унікальності, ефективності та безпеки для кожного штаму мікроорганізмів, що входять до складу лікарського засобу.

Специфічність і унікальність штамів мікроорганізмів вивчають в ході проведення бактеріологічних досліджень, а ефективність і безпеку прийому розробленого пробіотика підтверджують в клінічних дослідженнях. Експерти ВГО

підкреслюють, що отримані дані специфічності і унікальності, ефективності та безпеки одного пробіотика не можуть бути екстрапольовані на інші штами або види мікроорганізмів, що застосовуються в якості інших пробіотиків, так як навіть зміна складу додаткових речовин, що містяться в препараті (наповнювачі, баластні речовини, склад оболонки), може істотно змінити фармакологічні властивості лікарського засобу та знизити його ефективність.

Незважаючи на те, що в даний час немає стандартів маркування пробіотичних препаратів, ВГО рекомендує фірмам-виробникам вказувати не тільки рід, вид, штам мікроорганізмів, що входять до складу препарату відповідно до діючої мікробіологічної номенклатури, а й уточнювати, скільки життєздатних мікроорганізмів залишиться в лікарському засобі до моменту закінчення терміну його дії.

Експерти ВГО постійно рекомендують фірмам-виробникам пробіотичних препаратів вказувати якомога більше інформації про склад препарату, його передбачувану дію для повної інформованості споживачів про якість та властивості даної категорії лікарських засобів. Етикетка пробіотичного препарату повинна містити такі відомості:

- рід, вид використовуваних мікроорганізмів з обов'язковим зазначенням їх специфікації, повною науковою назвою штамів бактерій;
- кількість мікроорганізмів, яка містяться в препараті;
- кількість життєздатних штамів до моменту закінчення терміну придатності препарату;
- рекомендовані умови зберігання;
- безпечність препарату в умовах рекомендованого зберігання;
- рекомендована доза, необхідна для досягнення бажаного фізіологічного ефекту;
- точний опис фізіологічного ефекту, якого можна досягти при прийомі препарату при дотриманні всіх рекомендацій;
- контактна інформація фірми-виробника для проведення постмаркетингових досліджень [21].

1.2. Характеристика та класифікація дріжджів *Saccharomyces boulardii*

Дріжджі *Saccharomyces boulardii* – одноклітинні мікроскопічні недосконалі мікроорганізми, що відносяться до роду *Saccharomyces*. Ці мікроорганізми названі на честь французького вченого Анрі Булара, який виділив їх із тропічних плодів в Індокитаї, помітивши, що місцеві жителі використовують ці плоди при розладах травлення. Досліджуючи мікрофлору цих тропічних рослин, вчений виділив чисту культуру дріжджів, які володіли протидіарейними властивостями [22].

На сьогодні, дріжджі *S.boulardii* використовуються як джерело біологічно активних сполук, серед них: вітаміни, амінокислоти, мікроелементи і ферменти. Вони можуть слугувати продуцентами для фармацевтичної промисловості. Дріжджі мають протимікробну активність, антитоксичні ефекти, симбіотичні ефекти, імуномодулюючі ефекти та використовуються для профілактики і лікування шлунково-кишкового тракту, тому були взяті для досліджень.

У 1923 році дріжджі *Saccharomyces boulardii* були зареєстровані в Інституті Пастера, а у 1954 році права на штами живого дріжджового грибка придбали засновники компанії *Biocodex* [22]. З 2014 року фармацевтичні препарати з *S.boulardii* зареєстровані і продаються більш ніж в 90 країнах світу і мають більше 20 назв. Фізіологічні властивості дріжджів *Saccharomyces boulardii* дозволяють широко використовувати їх в лікуванні діареї різної етіології, особливо у дітей, та інших захворювань.

Згідно глобальної систематики біологічних видів можемо стверджувати, що дріжджі виду *Saccharomyces boulardii* мають такі таксономічні одиниці, як:

Домен: *Eukaryota*

Царство: *Fungi*

Підцарство: *Dikarya*

Відділ: *Ascomycota*

Клас: *Saccharomycetes*

Підклас: *Saccharomycotina*

Порядок: *Saccharomycetales*

Родина: *Saccharomycetaceae*

Рід: *Saccharomyces*

Вид: *Saccharomyces bulardii* [22].

1.2.1. Систематика дріжджів роду *Saccharomyces*

Дріжджі – одноклітинні мікроорганізми, що брунькуються або діляться, які відносяться до царства *Fungi*. Дріжджі, які використовуються у хлібопекрських і в бродильних, фармацевтичних виробництвах, відносяться до родини *Saccharomycetaceae*, роду *Saccharomyces*.

Дріжджі – позатаксономічна група одноклітинних грибів, які втратили міцеліальну будову у зв'язку з переходом до проживання в рідких і напіврідких, багатих органічними речовинами субстратах. Поєднують близько 1500 видів, які відносяться до класів аскоміцетів і базидіоміцетів.

До класу сумчастих грибів *Ascomycetes* до підкласу найпростіших сумчастих *Protoascales* відносять дріжджі, що утворюють при статевому розмноженні сумки (аски) з ендогенними спорами. До них належать представники родів дріжджів, які використовують у бродильних виробництвах – *Saccharomyces* і *Shizosaccharomyces*. В основу класифікації дріжджів покладені спосіб розмноження й деякі фізіологічні ознаки [23].

Головною систематичною ознакою дріжджів є здатність до утворювання спор. За цією ознакою вони діляться на дві групи: спорогенні, що здатні утворювати спори, і аспорогенні, які не утворюють спори, тобто не мають статевого розмноження.

На думку деяких дослідників, другу групу дріжджів слід віднести до класу недосконалих грибів *Fungy imperfecti*, хоча втрата здатності до статевого розмноження вторинна, і вони можуть бути також віднесені до сумчастих грибів.

Вперше класифікація дріжджів була оприлюднена в 1912 р. Гіл'ермоном [23, 24]. Уточненню класифікації спорових дріжджів, до яких відносять хлібопекарські

дріжджі, сприяла монографія В.І. Кудрявцева [25] і монографія Ж. Лоддера й Крегера ван Рій «Дріжджі і їх таксономічне дослідження», де наведені результати докладного вивчення недосконалих дріжджів, виявлені синоніми в найменуванні цілого ряду дріжджових культур.

В основу класифікації В.І. Кудрявцева покладений спосіб вегетативного розмноження спорогенних дріжджів, автор пропонує об'єднати всі дріжджі в один порядок одноклітинних грибів *Unicellomycetales*.

Спорогенні дріжджі він ділить на три родини за ознакою вегетативного розмноження:

1. Родина *Saccharomycetaceae* – дріжджі розмножуються брунькуванням. До цієї родини відносять роди *Saccharomyces*, що має найбільше практичне значення, *Pichia*, *Hansenula* та інші (усього 17 родів). Різняться вони за формою спор і способом їх утворення. Найбільше значення має вид *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Родина *Schizosaccharomycetaceae* – дріжджі розмножуються поділом. До цієї родини відносять два роди: *Schizosaccharomyces* і *Octosporomyces*.

3. Родина *Saccharomycodaceae* – розмноження починається брунькуванням і закінчується поділом. Головні роди цієї родини – *Saccharomycodes* і *Hanseniaspora*.

Дріжджі *Saccharomyces* розмножуються у виробничих умовах брунькуванням, а в несприятливих умовах – аскоспорами. Температурний оптимум для розмноження дріжджів знаходиться в межах 25...30 °С. Низькі температури дріжджі переносять добре, хоча розмноження їх призупиняється (мінімальна температура розвитку дріжджів 2...3 °С). При температурі 40 °С ріст і розвиток дріжджів припиняється, дріжджі відмирають.

Дріжджі відносяться до ацидофілів, тобто вони розвиваються в кислому середовищі з оптимальним значенням рН 4,5-5,0. Є факультативними анаеробами. В аеробних умовах вони активно ростуть і розмножуються, а в анаеробних – здійснюють спиртове бродіння (ефект Пастера).

Дріжджі чутливі до високої концентрації розчинених у середовищі речовин. При високій концентрації цукру в середовищі життєдіяльність дріжджів припиняється, тому що при цьому збільшується осмотичний тиск середовища і настає

плазмоліз клітин. Величина граничної концентрації цукру для різних рас дріжджів неоднакова.

У літературних даних по систематиці дріжджів відзначається, що таксономія дріжджів роду *Saccharomyces* усе ще залишається досить невизначеною й постійно змінюється. Однак з огляду на значну роль цього роду, видів і штамів у фармацевтичній промисловості та необхідність використання сучасної міжнародної класифікації, з'являється потреба перегляду й перевизначення таксономії колекційних культур, які класифікувалися по Кудрявцеву [25].

Рід *Saccharomyces* уперше був описаний в 1838 р. Мейеном і пізніше, в 1870 р. визначений Реєсом як *S. cerevisiae* у якості центрального виду [26-28].

Характерна риса роду *Saccharomyces* – це зброджування гексозних цукрів, однак типи зброджуваних цукрів варіюються залежно від виду дріжджів [29]. За класифікацією Курцмана відносяться такі види: *S. bayanus*; *S. cerevisiae*; *S. kudriavzevii*; *S. mikatae*; *S. paradoxus*; *S. pastorianus* і, можливо, *Suvarum*.

Систематика *Saccharomyces* неодноразово піддавалася перегляду на основі різного сполучення морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостей. Наприклад, винні дріжджі, відомі по старій літературі як *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces oviformis* у цей час віднесені до *S. cerevisiae* або *S. bayanus*. Пивні дріжджі, раніше відомі як *Saccharomyces carlsbergensis* і *Saccharomyces uvarum*, перейменовані в *S. cerevisiae* або *S. pastorianus*.

На сьогодні до роду *Saccharomyces* відносяться дріжджі, у яких вегетативна фаза переважно диплоїдна. Аскоспори кулевидні або еліпсоїдні із гладкою стінкою, від однієї до чотирьох спор в сумці. Види дріжджів роду *Saccharomyces* характеризуються круглими, овальними або еліптичними клітинами, які розмножуються брунькуванням.

Молекулярні методи суттєво полегшують прискорену ідентифікацію й диференціацію видів і штамів усередині роду. У цей час для вирішення цих завдань використовуються різні молекулярні методи та їхні варіації, які на думку Курцмана ще мають потребу в оцінці й стандартизації з погляду їхньої точності й відтворюваності [30].

1.2.2. Морфологічні та фізіологічні ознаки дріжджів *S.boulevardii*

Дріжджі *S.boulevardii* – це овальні клітини, які мають довжину приблизно 10 мкм та ширину 5 мкм [31]. Клітинна стінка дріжджів *S.boulevardii* становить приблизно 30% сухої маси клітини і складається переважно з полісахаридів (85%) та білків (15%) [31]. Широкі біохімічні аналізи виявляють, що глюкоза, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) та залишки манози становлять 80-90%, 1-2% та 10-20% загального полісахариду [31].

Дріжджі *S.boulevardii* класифікується як анаероби, тобто вони можуть рости в аеробних або анаеробних умовах [32]. Дріжджі *S.boulevardii* – гетеротрофи, тобто вони отримують свою енергію з глюкози [32].

Дріжджі *S.boulevardii* діють як човник для вивільнення ферментів, білків, трофічних факторів під час кишкового транзиту для поліпшення імунного захисту господаря, травлення та засвоєння поживних речовин [33]. Дріжджі *S.boulevardii* здатні виділяти поліаміни (спермін та спермідин) під час кишкового транзиту для регулювання експресії генів і, в свою чергу, синтезу білка [33].

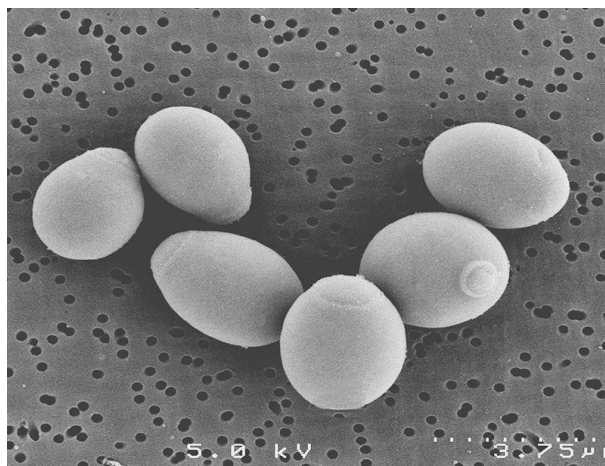


Рис.1.7. Мікроскопія клітин дріжджів *Saccharomyces boulevardi*, × 1300

Дріжджі широко поширені в природному середовищі, на рослинах, в повітрі і воді, в харчових продуктах, в лікарських препаратах і в багатьох інших екологічних

нішах, включаючи нормальну мікрофлору людини. Дріжджі взаємодіють з іншими мікроорганізмами, включаючи симбіоз, паразитизм і конкуренцію [34].

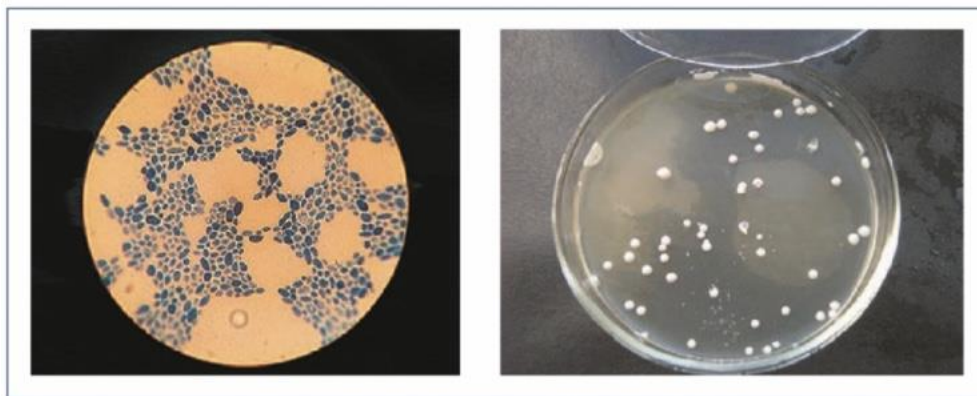


Рис.1.8. Форма клітин та колоній дріжджів виду *Saccharomyces boulardii* на поживному середовищі

Порівняльний аналіз структури окремих генів і геномів *S.boulardii* і відомих хлібопекарських дріжджів *S.cerevisiae* показав, що ці види є практично ідентичними. Але згодом було встановлено, що вони відрізняються за таксономією, метаболічними та генетичними характеристиками.

У проведеному в 2007 р. дослідженні було виявлено, що дріжджі *S.boulardii* відрізняються кількістю копій генів в субтеломерних областях і ретротранспозонів. Відмінності спостерігалися як на геномному, так і на фізіологічному рівнях, особливо при споруляції. Вони полягали в різниці числа хромосом і кількості копій гена, здатності до виживання при низьких рівнях рН, причому остання особливість має пряме відношення до пробіотичної природи *S.boulardii*.

Вони належать до класу пробіотиків, основним призначенням яких є боротьба з патогенними мікроорганізмами у кишківнику, мають властивості, що зумовлюють перевагу даних препаратів:

- *S.boulardii* не колонізують кишківник (через 2-5 днів після припинення прийому препарату їх не виявляють у фекаліях);
- не проникають через кишковий бар'єр;
- мають високу «комфортну» температуру для розмноження порівняно з іншими мікроорганізмами – 37 °С;

- мають високу життєздатність;
- їм властива генетично детермінована антибіотикорезистентність;
- не пригнічують ріст облігатної мікрофлори кишківника.

Дріжджі *S.boulardii* у складі пробіотика – ліофілізовані, їх обробляють шляхом кріодесцензації або гарячого висушування. Здатність цих мікроорганізмів до відновлення їх життєздатності визначає фармакодинамічні властивості препарату. При пероральному прийомі ліофілізованої форми дріжджів, вони швидко дістаються шлунково-кишкового тракту у високих концентраціях та залишаються живими до їх виведення з кишківника.

Клітини дріжджів *S.boulardii* зазвичай мають розміри 5^{-10} x 5^{-13} мкм, круглу або овальну форму, розмножуються брунькуванням, добре фарбуються метиленовим синім. Дріжджі *S.boulardii* накопичуються на щільних і рідких поживних середовищах при рН 5,4 5,5 і температурі 30 °С, але можуть розмножуватися при більш високій температурі (37 °С), і в більш широкому діапазоні рН.

Дріжджі *S.boulardii*, як і всі представники роду *Saccharomyces*, на щільних поживних середовищах формують великі гладкі опуклі білого або кремового кольору колонії; на рідких середовищах дають легке помутніння і осад. Ці дріжджі ферментують деякі вуглеводи з утворенням кислоти і газу через 24-72 год інкубації при 30 °С. Дріжджі *S.boulardii* володіють унікальними фізіологічними властивостями, такими як толерантність до змін рН, температури і резистентність до кислот, жовчі і ферментів. Вони ростуть при 37 °С, тобто при незвично високій температурі для дріжджів.

Вони мають пряму антагоністичну дію щодо багатьох видів патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів: *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Gardia lamblia*, *Klebsiela spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella spp.*, *Entamoeba histolytica*, відновлюють кишкову флору і покращують травлення [34].

Результати досліджень на тваринах і клітинних моделях дозволяють припустити, що пригнічення патогенів дріжджами *S.boulardii* пов'язано з синтезом речовин, які конкурують з бактеріальними токсинами і модуляцією сигнальних

шляхів клітин господаря, залучених в протизапальну відповідь при бактеріальній інфекції. Крім того, ці дріжджі стимулюють продукування глікопротеїнів в мікроворсинки слизової оболонки кишківника, в тому числі і гідролаз, транспортерів, секреторних IgA, рецепторів для імуноглобулінів.

Попадання дріжджів у кишківник призводить до збільшення вироблення регуляторних цитокінів, які відіграють велику роль в реалізації захисних функцій. У ліофілізованому вигляді дріжджі *S.bouardii* рекомендують в якості активної речовини в протидіарейних, антимікробних лікарських препаратах. Їх відмінністю від більшості пробіотиків є резистентність до шлункового соку. Завдяки цьому вони в життєздатному стані потрапляють в кишківник [35,36].

Ліофілізовані клітини дріжджів *S.bouardii* використовують як пробіотик для лікування і профілактики діареї, який має антимікробну та антитоксинну дію по відношенню до бактеріальних цито- і ентеротоксинів, підвищує ферментативну функцію кишківника, володіє природною стійкістю до антибіотиків, проходить через травну систему в незмінному вигляді без колонізації і повністю виводиться з організму протягом 2-5 днів після припинення прийому.

Таким чином, нові дані про властивості дріжджів дозволяють розширити можливості їх застосування в медицині і харчовій промисловості, отримувати нові функціональні продукти для збереження здоров'я, активності і працездатності людини.

1.2.3. Терапевтичні властивості та механізм дії дріжджів *S.bouardii*

Ефективність пробіотиків – це видоспецифічна характеристика, яка не може бути екстрапольована на різні види або штами. Мікроорганізми *S.bouardii* є штамом дріжджів виду *Saccharomyces cerevisiae*. Генетично ці два мікроорганізми досить близькі, але у дріжджів *S.bouardii* по-іншому відбувається синтез білка і реакції на стрес. Завдяки цьому доїжджі *S.bouardii* мають більш широкий діапазон температурного оптимуму і вищу кислотостійкість, тому швидше колонізують кишковий тракт.

Приналежність до дріжджів зумовлює природну стійкість мікроорганізмів *S.bouardii* до антибіотиків, що вигідно вирізняє їх з-поміж пробіотиків бактеріальної природи [37]. На сьогодні дріжджі *S.bouardii* застосовують в усьому світі для профілактики і лікування при інфекційній діарей різної етіології. Терапевтичні ефекти і механізми дріжджів *S.bouardii* при діарей наведено у табл.1.1.

Окремі терапевтичні ефекти дріжджів *S. bouardii* при діарей пояснюються прямим впливом на модуляцію кишкових мікробів. Інші механізми включають трофічний вплив на ентероцити, зниження бактеріальної вірулентності за рахунок зв'язування токсинів і рецепторів патогенів, а також втручання в рухливість бактерій та їх транслокацію [38]. Зазначимо, що дріжджі *S. bouardii* здійснюють модулюючий вплив на імунну систему хазяїна, підвищуючи активність її стану: зростає стійкість до ентеропатогенних бактеріальних інфекцій (локальний рівень) і підвищується щільність макрофагів печінки (системний ефект).

Генетично зумовлена стійкість дріжджів *S.bouardii* до дії антибіотиків дозволяє застосовувати їх одночасно з антибіотиками для захисту нормального мікробіоценозу травного тракту.

Глибоке розуміння механізмів дії дріжджів важливе для наукового усвідомлення їх потенційних переваг. До цих механізмів відносять регуляцію кишкового мікробного гомеостазу, перешкоду здатності патогенів утворювати колонії та інфікувати слизову оболонку, модуляцію місцевої та системної імунних відповідей, стабілізацію бар'єрної функції шлунка і кишковика, інгібування прокарциногенних ферментів, стимуляцію активності ферментів, що полегшують всмоктування і засвоєння поживних речовин [38].

Як і всі дріжджі, мікроорганізми *S. bouardii* мають природну стійкість до антибіотиків, сульфаніламідів та інших антибактеріальних препаратів. Ця властивість принципово відрізняє дріжджі *S. bouardii* від пробіотиків на основі біфідобактерій і лактобацил і дозволяє використовувати їх одночасно з курсом антибіотиків [38].

Головні механізми дії дріжджів *S.bouardii*:

– прямий антагонізм (антимікробна дія), пов'язаний зі здатністю *S.boulevardii* пригнічувати ріст патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, які порушують мікробіоценоз кишківника.

– антитоксична дія, яка зумовлена виробленням протеаз, що розщеплюють токсин та діють на рецептор ентероцита, з яким зв'язується токсин (особливо відносно цитотоксину А, *Clostridium difficile*);

– антисекреторна дія (зменшує секрецію води і солей в просвіт кишківника) забезпечується шляхом зниження утворення цАМФ в ентероцитах;

– підсилення неспецифічного імунного захисту внаслідок підвищення продукції IgA та секреторних компонентів інших імуноглобулінів;

– ферментативна активність зумовлена підвищенням активності дисахаридаз тонкого кишківника (лактази, сахарази, мальтази);

Дріжджі *S.boulevardii* володіють антимікробними властивостями, які забезпечують захист мікрофлори кишківника від патогенних бактерій або шляхом розщеплення токсину, або шляхом зниження рівня цАМФ. Показано, що дріжджі *S.boulevardii* перешкоджають утворенню біоплівки патогенними штамами. Крім того, вони стимулюють протимікробну дію, прилипаючи до мембрани слизової оболонки кишківника і усуваючи патогени шляхом запобігання їх адгезії до кишківника. У ліофілізованій формі дріжджі *S.boulevardii* стійкі до дії шлункового соку і жовчі і зберігаються живими у всіх відділах шлунково-кишкового тракту.

Дріжджі не проникають за межі кишкової трубки в мезентеріальні лімфатичні вузли та інші органи і не викликають гістологічних змін слизової оболонки кишківника. Одним з найбільш значущих і специфічних механізмів дії є здатність дріжджів *S.boulevardii* індукувати і стимулювати продукування кишкових поліамінів. Такі поліаміни, як спермідин і спермін посилюють експресію генів гідролаз, протеаз і транспортних молекул. В даний час пробіотики, пребіотики, синбіотики і дієтичні волокна вважаються сучасними і перспективними терапевтичними засобами. Актуальною є розробка функціональних біологічно активних добавок (БАД) з доповненим вмістом нутрицевтиків.

Дріжджі *S.boulevardii* впливають на синтез ізофлавононів і фенолів, що підвищує антиоксидантні властивості продуктів. Виявлено, що позаклітинні фракції дріжджів *S.boulevardii* можуть містити поліфенольні метаболіти, в тому числі ванілову та коричну кислоти, фенілетиловий спирт, вітамін В та ін.

Таблиця 1.1

Терапевтичні ефекти і механізми дріжджів *S. boulevardii* при діареї [39]

Механізми	Терапевтичні ефекти
Терапевтичні механізми	<ul style="list-style-type: none"> – Зв'язування збудників на поверхні слизової оболонки кишківника; – Перешкоджання адгезії та колонізації збудників; – Продукування бактеріоцинів.
Антитоксичні механізми	<ul style="list-style-type: none"> – Блокування рецепторів токсинів патогенів; – Пряма руйнівна дія протеолітичних ферментів на токсини патогенів; – Хибна ціль для рецепторів патогенів («приманка»).
Метаболічні механізми	<ul style="list-style-type: none"> – Збільшення кількості коротколанцюжкових жирних кислот; – Вивільнення поліамінів (сперміну, спермідину) і ферментативний вплив на розвиток ентероцитів.
Антисекреторний ефект	– Зниження рівня циклічного аденозинмонофосфату в ентероцитах і, відповідно, – виділення води і натрію в порожнину кишківника.
Ферментативний ефект	– Підвищення активності гліколітичних ферментів тонкої кишки.
Протизапальний ефект	– Знижує продукування прозапальних цитокінів.
Імуномодулюючі механізми	<ul style="list-style-type: none"> – Підвищує рівень секреторного імуноглобуліну А; – Стимулює активність Т-регуляторних клітин; – Пригнічує активацію Т-лімфоцитів дендритних клітин; – Знижує рівень нітрооксиду і нітродсинтетази.

Симбіотичний ефект	– Сприяє відновленню нормальної мікробіоти.
--------------------	---

Введення дріжджів *S.bouardii* призводить до збільшення вироблення регуляторних цитокінів, які відіграють велику роль в реалізації їх захисних ефектів. Це здійснюється шляхом взаємодії з дендритними клітинами, які продукують регуляторні цитокіни або стимулюють Т-клітини з подібними властивостями, дріжджі *S.bouardii* посилюють сигнальні шляхи, пов'язані з протизапальними реакціями завдяки регуляції вироблення інтерлейкінів IL-10, IL-18, L-23A, фактора некрозу пухлини (TNF) -а, IL-126, ітерферона-γ (INF-γ), IL-17A в колонізуючій слизистій оболонці кишковика. Так само дріжджі *S.bouardii* можуть ефективно викликати імунну відповідь, збільшуючи рівні IgA і IgG і модифікувати здатність лімфоцитів прикріплюватися до ендотеліальних клітин, приводячи до поліпшення їх міграції та адгезії.

Антитоксична дія дріжджів *S.bouardii* обумовлена виробленням певних білків. Білок масою 54 кДа є серинпротеазою і пригнічує ентеротоксичну і цитотоксичну активність патогенних мікроорганізмів шляхом протеолізу токсину А і його рецепторів. Цей білок гальмує секрецію води та електролітів. Кишкова проникність для маннітола в присутності дріжджів *S.bouardii* знижується на 93%. Білок масою 120 кДа не володіє протеолітичною активністю. Він специфічно перешкоджає розвитку гіперсекреції, викликаній токсинами *Vibrio cholera*, шляхом зниження концентрації циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) у кишкових клітинах. Метаболічні зміни в слизистій оболонці кишковика, викликані холерним токсином, зменшуються в тому випадку, якщо дріжджі *S.bouardii* сприятливі до впливу холерного токсину.

Дріжджі *S.bouardii* стійкі до дії соляної кислоти. Ці дріжджі є для людини транзиторною флорою, тому через 2-5 днів після закінчення прийому препарату повністю виводяться з організму без побічних явищ. Механізм антитоксичної дії *S.bouardii* обумовлений виробленням певних білків. Один з цих білків з молекулярною масою 120 кДа не володіє протеолітичною активністю, але пригнічує

синтез циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) і таким чином зменшує прояви діареї.

Пригнічення мікроорганізмів дріжджами пояснюється також конкуренцією за поживні речовини, зміною рН середовища, утворенням високих концентрацій етанолу, секрецією антибактеріальних сполук і вивільненням антимікробних сполук, таких як кілер-токсини або «мікоцини». Мікоцини – позаклітинні білки або глікопротеїни, які порушують функцію клітинної мембрани у сприйнятливих дріжджів, які несуть рецептори для з'єднання. Їх активність спрямована насамперед на дріжджі, тісно пов'язані з виробничим штамом, який має захисний фактор.

Відмінною рисою дріжджів *S.boulardii* від більшості інших пробіотичних мікроорганізмів (в тому числі від біфідо- і лактобактерій і ентерококів) є резистентність до кислого середовища шлунка. Дріжджі *S.boulardii* стимулюють ферментативну функцію кишківника, підвищуючи активність дисахарідаз епітелію кишківника: лактази, сахарозо-альфа-глюкозидази та мальтази. Відомо, що прийом даних дріжджів збільшує активність лактази на 77%, сахарази на 82%, мальтази – на 75% [39].

У роботі [39] порівнювали штами дріжджів *S.cerevisiae* і *S.boulardii* NCYC-3264 з точки зору їх реакції на різні стресові стани, антиоксидантну активність і вироблення терапевтично важливих вторинних метаболітів. Істотної різниці в закономірностях накопичення біомаси цих дріжджів не встановлено, але дріжджі *S.boulardii* володіли більшою життєздатністю в порівнянні з дріжджами *S. cerevisiae*. Окрім того, дріжджі *S.boulardii* збільшили антиоксидантний потенціал субстрату в 6-10 разів у порівнянні з дріжджами *S.cerevisiae*, продукуючи в 70 і 20 разів більше фенолів і флавоноїдів в позаклітинній фракції.

Дріжджі *S.boulardii* каталізують розпад фітатів, що призводить до значного поліпшення біодоступності мінералів і вітамінів в біологічно активних речовин рослинного походження [39].

1.3. Висновки до розділу

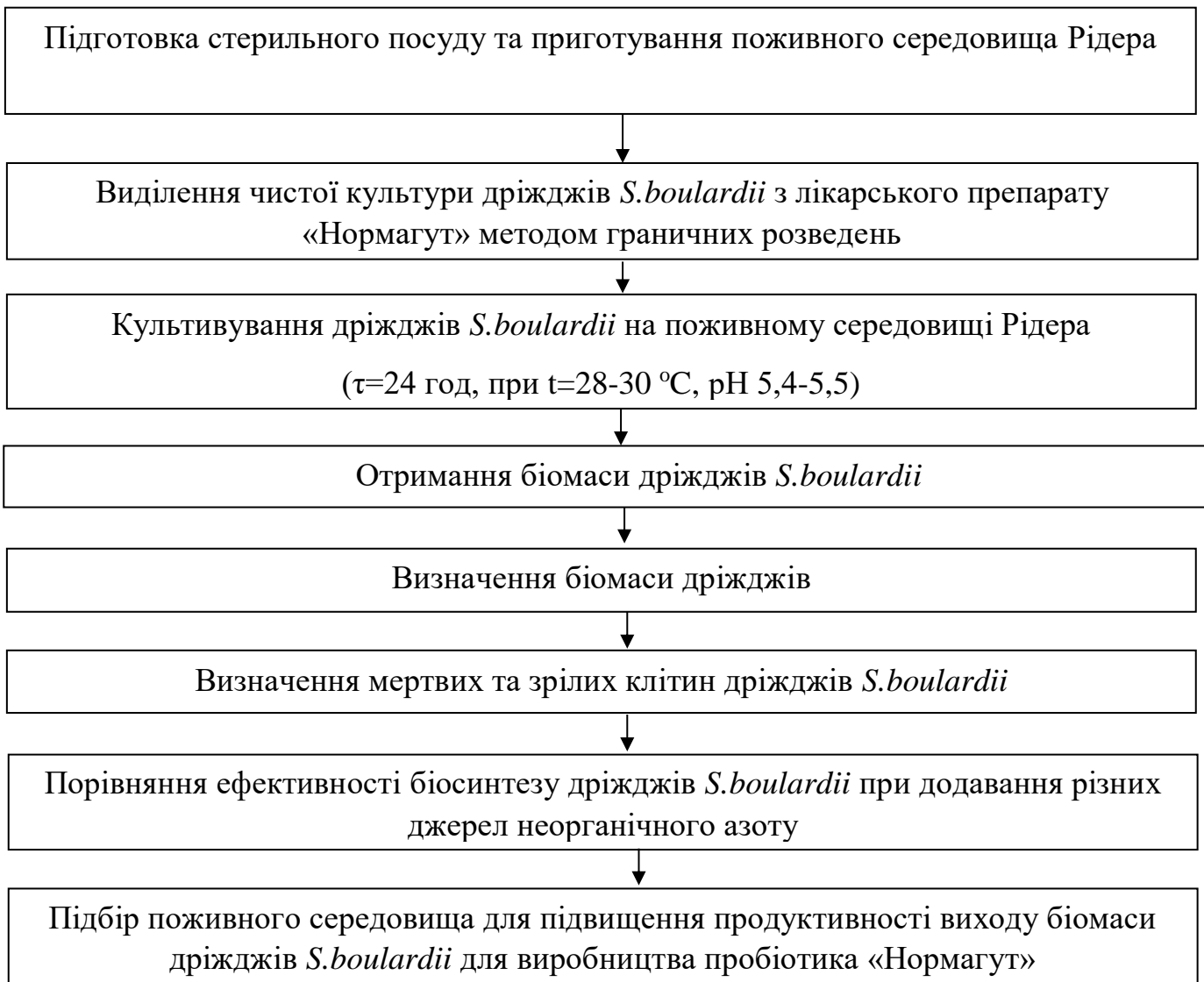
З'ясовано, що результати багаторічного застосування мікроорганізмів *S.boulardii* свідчать про безпечність цих дріжджів і ефективність їх використання для попередження і лікування деяких захворювань шлунково-кишкового тракту. Завдяки комплексній антимікробній та антиоксидантній дії пробіотичний препарат «Нормагут», що містить у своєму складі ці дріжджі, рекомендований для терапії діареї різного генезу у дорослих і дітей. Трофічна, імуномодулююча і стимулююча дія даного пробіотика допомагає подолати наслідки антибіотикотерапії, бактеріальних, протозойних і вірусних інфекцій.

Дріжджі *S.boulardii* продукують цілий ряд вторинних метаболітів-нутрицевтиків, в тому числі антиоксидантів, які позитивно впливають на здоров'я людини. Можливості комп'ютерного моделювання, інтеграції експериментальних даних заснованих на метаболізмі дріжджів *S.boulardii* можуть стати важливими інструментами для прогнозування оптимальних інженерних стратегій для створення інноваційних технологій лікарських препаратів і біологічно активних добавок з функціональними властивостями.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження з використанням дріжджів *S.boulardii*, виділених з пробіотика «Нормагут» проводили за схемою:



2.1. Об'єкти досліджень

2.1.1. Характеристика лікарського препарату «Нормагут»

Склад лікарського препарату «Нормагут»: діюча речовина – ліофілізовані сухі дріжджі *S.boulardii*. 1 капсула містить 250 мг ліофілізованих сухих дріжджів *S.boulardii* з мінімумом 1010 клітин/г, що включає: 221,25 мг дріжджів і 28,75 мг лактози моногідрату; допоміжні речовини: лактоза безводна, магнію стеарат, желатин, титану діоксид (E 171), заліза оксид жовтий (E 172), мідні комплекси хлорофілінів (E 141), вода очищена.

Лікарська форма: капсули.

Основні фізико-хімічні властивості: продовгасті, блискучі, непрозорі, тверді желатинові капсули зі світло-зеленим корпусом і жовтою кришечкою. Капсули містять гранульований порошок жовто-сірого кольору з характерним запахом.

Фармакотерапевтична група: антидіарейні мікробні препарати. Код АТС А07F А02 [40].

Фармакологічні властивості: «Нормагут» сприяє відновленню нормальної мікрофлори кишкового тракту, чинить виражену етіопатогенетичну антидіарейну дію. При проходженні через травний тракт дріжджі *S. boulardii* чинять біологічну захисну дію відносно нормальної кишкової мікрофлори.

Фармакокінетика: після прийому препарату «Нормагут» швидко досягається висока концентрація дріжджів *S. boulardii* у товстому кишковоки, яка підтримується протягом доби. Дріжджі *S. boulardii* не проникають у системний кровотік і мезентеріальні лімфатичні вузли. Після закінчення лікування дріжджі *S.boulardii* повністю виводяться з калом протягом 3–5 днів.

Показання: профілактика і лікування колітів та діареї, пов'язаних із прийомом антибіотиків; дисбіоз кишечника; гостра та хронічна бактеріальна діарея; синдром подразненого кишечника.

Термін придатності ліків до 2 років. Упаковка містить по 10 капсул у блістері; по 1 або по 3 блістери у картонній упаковці. Випускаються ліки без рецепту. Пробиотичний препарат «Нормагут» виробляється в Німеччині [40].

2.1.2. Характеристика дріжджів *S.boulardii*

Для експериментальної роботи об'єктом дослідження був штам дріжджів *S.boulardii*, виділений з комерційного препарату «Нормагут»® (виробник – «Ардейфарм ГмбХ», Німеччина).

Дріжджі *S.boulardii* мають овальні клітини, довжиною приблизно 10 мкм та шириною 5 мкм (24). Вони накопичуються на щільних і рідких поживних середовищах при рН 5,4-5,5 і температурі 28-30 °С, але можуть розмножуватися при більш високій температурі (37 °С) і у більш широкому діапазоні рН.

2.1.3. Поживне середовище та умови субкультивування дріжджів *S.boulardii*

До складу поживних середовищ повинні входити органічні елементи (вуглець, водень, кисень, азот), зольні макроелементи (фосфор, сірка, калій, кальцій, магній, залізо) та деякі мікроелементи (марганець, мідь, натрій, хлор, цинк, бор, молібден та ін.). Перераховані елементи повинні знаходитися в формі легкозасвоюваних мікроорганізмами зв'язках. Вуглець найбільш легко споживається мікроорганізмами гетеротрофами в формі глюкози. Крім глюкози гетеротрофи засвоюють цукри, спирти, органічні кислоти та інші сполуки. Джерелом азоту можуть бути білкові речовини, пептони, амінокислоти, солі амонію, нітрати. Інші елементи вводяться у вигляді солей. Джерелом ростових речовин частіше є дріжджові екстракти або дріжджові автолізати, рідше – розчини вітамінів, амінокислот, пуринових і піримідинових основ. Поживні середовища повинні бути збалансовані за складом,

ізотонічними по концентрації розчинних речовин, мати оптимальну вологість, в'язкість, реакцію середовища (рН), окислювально-відновлювальний потенціал [41].

За складом поживні середовища поділяються на природні (натуральні) і штучні (синтетичні). Натуральні середовища складаються з продуктів тваринного і рослинного походження, мають складний і непостійний склад. Їх використовують для вирощування мікроорганізмів, накопичення біомаси, зберігання чистих культур, діагностичних цілей, але вони малоприсадибні для вивчення фізіології обміну речовин. Найбільш часто використовують такі натуральні середовища: м'ясо-пептонний бульйон (агар), пивне сусло і сусло-агар, дріжджову воду, капустиане середовище тощо. Синтетичні середовища мають у своєму складі визначені хімічні органічні та неорганічні сполуки в точно зазначених концентраціях (амінокислоти, цукри, вітаміни, мінеральні солі).

По набору компонентів синтетичні середовища можуть бути складними (середовища для вирощування молочнокислих бактерій) і досить простими (середовища для автотрофних мікроорганізмів). Їх готують для дослідження обміну речовин, з'ясування закономірностей росту або біосинтезу будь-якого метаболіту і т.д. Найбільш часто в практичній роботі використовують синтетичне середовище Чапека для вирощування грибів, середовище Рідера для дріжджів та ін.

За призначенням розрізняють універсальні, елективні та диференційно-діагностичні середовища. До універсальних (основних або стандартних) середовищ, сприятливих для вирощування багатьох видів мікроорганізмів відносять: м'ясопептонний бульйон, неохмельоване пивне сусло та ін. Елективні середовища забезпечують розвиток тільки певних мікроорганізмів або групи споріднених видів і непридатні для зростання інших. Елективні середовища застосовують для виділення мікроорганізмів з природних середовищ існування або виробничих субстратів, отримання накопичувальних культур.

Диференційно-діагностичні або індикаторні середовища використовують для диференціювання видів мікроорганізмів та ідентифікації чистих культур на основі вивчення їх біохімічних властивостей.

За консистенцією поживні середовища бувають рідкими, щільними і сипучими. Рідкі середовища застосовують для накопичення біомаси або продуктів обміну, підтримки клітин в активному стані, зберігання, дослідження фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів, аналізу мікрофлори різних об'єктів, виділення чистих культур мікроорганізмів, отримання ізольованих колоній, вивчення їх культуральних особливостей, кількісного вивчення клітин, зберігання чистих культур в музеях, транспортування їх на заводи і т. д., *сипучі* (висівки, розварене пшоно, свекловий жом, жмихи, ґрунт) – для зберігання деяких вказаних видів мікроорганізмів та їх спор, приготування посівного матеріалу.

На сьогодні відомо декілька видів біологічних поживних середовищ для накопичення біомаси дріжджів:

1. Стандартні повноцінні поживні середовища. Ці середовища застосовують для найбільш повного обліку та виділення більшості видів дріжджів. Найбільш широко використовуваними повноцінними середовищами для вирощування більшості дріжджів є солодове сусло, сусло-агар, агар Сабуро (глюкозопептонне середовище), амонійно-глюкозні середовища.

2. Селективні середовища. Їх застосовують для дріжджів зі специфічних місць проживання.

3. Диференціальні середовища. Їх використовують при виділенні дріжджів з субстратів, сильно забруднених іншими мікроорганізмами. Для пригнічення зростання супутніх мікроорганізмів до середовища додають різні інгібітори (кислоти і антибіотики широкого спектру дії (стрептоміцин, левоміцетин, пеніцилін) [41].

В роботі було використано синтетичне поживне середовище Рідера, тому що воно більш просте в приготуванні для виділення дріжджів.

До складу поживного середовища Рідера входить (г/л): сульфат амонію – 3, сульфат магнію – 0,7, нітрат кальцію – 0,04, хлорид натрію – 0,5, дигідрофосфат калію – 1,0, гідрофосфат калію – 0,1, агар-агару – 20. Початкове рН середовища 6,6. Для вивчення розмноження дріжджів додають 2 % цукру. Агар розчиняли шляхом нагрівання на плиті, постійно перемішуючи. Стерилізували в автоклаві при температурі 115-120 °С, тиску 0,5 атм протягом 20-30 хв, рН 5,4-5,5. Поживне

середовище після автоклавування розливали в заздалегідь приготовані стерильні висушені чашки Петрі та лишали для застигання [41].

Дріжджі *S.boulardii* вирощували в термостаті у стерильних умовах на синтетичному поживному середовищі Рідера, при температурі 30 °C протягом 48 годин. Після чого підраховували накопичені колонії клітин продуцента (при посіві на середовище Рідера у чашки Петрі через 15 діб утворюються круглі, гладкі і опуклі колонії з рівними краями).

2.1.4. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера для вирощування дріжджів *S.boulardii*

Стадія ферментації є основною стадією в біотехнологічному процесі. На цій стадії відбувається взаємодія продуцента з субстратом і утворення цільових продуктів (біомаси, ендо- та екзопродуктів). Ця стадія здійснюється в біохімічному реакторі (ферментері) і може бути організована в залежності від особливостей використаного продуценту і вимог до типу і якості кінцевого продукту різними способами.

Ферментація може проходити в строго асептичних умовах або без дотримання правил стерильності (так звана «незахищена» ферментація). Ферментація може здійснюватися на рідких (рідкофазна) і на твердих (твердофазна) середовищах; анаеробно і аеробно. Аеробна ферментація може протікати поверхнево або глибинно (по всій товщі живильного середовища).

Забезпечення процесу ферментації зводиться до поступання в ферментер потоків (інокуляту, повітря (або газових сумішей), живильних біогенів, піногасників) і відводу з нього тепла, відпрацьованого повітря, культуральної рідини, а також вимірюванню і стабілізації основних параметрів процесу на рівні, необхідному для оптимального розвитку продуцента і утворення цільового продукту [42].

В залежності від застосовуваних методів оцінки роботи ферментери для глибинного культивування мікроорганізмів поділяють на ряд груп за такими ознаками:

– за способом культивування на апарати: безперервної та періодичної дії;

- за стерильністю на: герметичні і ті, що не вимагають суворої герметичності;
- за конструктивними ознаками на: ферментатори з дифузором і турбіною, з обертовими аераторами, з механічними мішалками, з зовнішнім циркуляційним контуром, колонні ферментери, з ежекційною системою аерації;
- за способом введення енергії і організації перемішування і аерації на апарати: з підведенням енергії до газової фази, до рідкої фази і комбіновані.

Біологічним агентом є дріжджі, вони по відношенню до кисню є анаеробами. Тому, для вирощування першої генерації в колбах необхідно створити анаеробні умови. Для проведення процесу основного біосинтезу необхідно обрати біореактор, який зможе задовольнити усі потреби продуцента.

У роботі процес біосинтезу здійснюється в біореакторі з механічним перемішуванням. Оскільки дріжджі є анаеробами, не потрібна система подавання повітря та піногасника в апарат. У зв'язку з меншою інтенсивністю біохімічних процесів і зменшеним тепловиділенням також спрощується система тепловідводу. Анаеробний біореактор має підводи для посівного матеріалу, поживного середовища, пари, води, відводи продуктів ферментації та газів, що виділяються.

Було визначено, що об'єм культуральної рідини становить 35 літрів. Враховуючи те, що процес біосинтезу дріжджів не потребує подачі повітря, а також має дуже малу ефективність перемішування, можемо обрати коефіцієнт заповнення 0,7. Враховуючи це, геометричний об'єм ферментера становить 50 літрів.

Реактор виготовлений з нержавіючої сталі і має спіральний нагрівальний елемент, призначений для ефективного і однорідного нагрівання. Відношення висоти ємності до її діаметра становить 3:1. Biostat® D 50 поставляється з цифровою системою вимірювання та управління параметрами процесу, датчиками температури, рН і чотирма вбудованими перистальтичними насосами [43].

Після проведення патентного пошуку було обрано інокулятори та ферментер компанії «Sartorius Stedim Systems» (Німеччина), для підготовки посівного матеріалу та культивування [43]. Ця фірма випускає промислові ферментери серії BIOSTAT D-DCU об'ємом від 10 л до 30 м³. Рамна конструкція з нержавіючої сталі забезпечує

простоту в обслуговуванні. Контроль показників рН, оптичної густини, температури, швидкості обертання мішалки здійснює вбудований блок управління.

BIOSTAT D-DCU – новітній реактор, розроблений з урахуванням найсучасніших технологій і напрямків дизайну, призначений для роботи з мікроорганізмами і культурами клітин. Технічні характеристики даного типу ферментера:

- Об'єм ферментера – 500 л;
- Робочий тиск у апараті 0,29 Мпа;
- Потужність двигуна до 6000 Вт;
- Вбудований модуль дозування газів;
- Діапазон управління температурою від -8 °С, що вище температури охолоджуючої води до 90 °С;
- Температура стерилізації до 130 °С;
- Кольоровий сенсорний дисплей;
- 6-ти лопатева дискова мішалка або 3-х лопатева сегментна.

Блок управління ферментаційної системи виготовлений також з нержавіючої сталі і містить всі необхідні компоненти: перетворювач частоти, клапани та потужну цифрову систему вимірювання та управління. Використання цієї системи дозволяє досягти більш високої надійності роботи ферментера.

Функціональні можливості програмного забезпечення ферментера дозволяють проводити вимірювання параметрів процесу, автоматичне калібрування і управляти замкнутими робочими циклами. У стандартне оснащення входить система стерилізації реактора, що включає в себе впускні і випускні повітряні фільтри. Ергономічний інтерфейс в поєднанні з надійною, функціонально-орієнтованою структурою меню, гарантує мінімальне навчання і легку роботу.

У даному типі ферментера оптимальним буде періодичне культивування дріжджів *S.boulardii*, оскільки забезпечити строго асептичні умови під час безперервного культивування неможливо.



Рис. 2.2. Ферментер BIostat D-DCU для культивування дріжджів *S.bouardii*

Отже, для культивування дріжджів *S.bouardii* з метою отримання пробіотика «Нормагут» підбрано сучасний тип ферментера серії BIostat об'ємом 500 л, посівний апарат об'ємом 50 л та інокулятор об'ємом 5 л, для збільшення виходу дріжджів за більш короткий проміжок часу.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Виділення чистої культури дріжджів *S.bouardii* з лікарського препарату «Нормагут» методом граничних розведень

Чистою культурою мікроорганізмів називають популяцію бактерій одного виду, що представляє потомство однієї клітини. Виділення чистої культури передбачає проведення трьох етапів:

- 1) отримання накопичувальної культури;
- 2) виділення чистої культури;
- 3) визначення чистоти виділеної культури.

Отримання ізолюваних колоній на твердому поживному середовищі досягається або шляхом посіву суспензії мікроорганізмів шпателем (метод Коха), або за допомогою бактеріологічної петлі (метод посіву штрихом). В результаті механічного роз'єднання клітин мікроорганізмів кожна з них може дати початок ізолюваній колонії одного виду мікробів. Основним завданням методу є розведення концентрації мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі з таким розрахунком, щоб після висіву його на поживне середовище вирости ізолювані колонії. Існують два основні методи розведення досліджуваного матеріалу:

- попереднє розведення матеріалу в фізіологічному розчині або в стерильній водопровідній воді в пробірках і висів готового розведення на щільне поживне середовище;

- на поверхні щільного поживного середовища «методом виснажливого посіву».

Посів шпателем (метод Коха) роблять у наступній послідовності:

- на поверхню поживного середовища в чашці №1 наносять стерильною піпеткою краплю накопичувальної культури і розподіляють її стерильним шпателем;

- шпатель дістають, чашку швидко закривають і переносять шпатель в чашку № 2, не стерилізуючи його. Імітують розподіл культури по всій поверхні середовища, торкаючись до її поверхні тієї ж стороною шпателя, на якій раніше розподіляли пробу;

- точно ті ж дії проводять і в чашці № 3, після чого шпатель стерилізують;

- засіяні чашки поміщають в термостат та інкубують при оптимальній температурі.

Через певний час чашки дістають з термостата і вивчають ріст мікроорганізмів. Зазвичай в чашці № 1 спостерігають суцільний ріст бактерій, в наступних чашках відзначають колонії.

Посів петлею (метод посіву штрихом) передбачає висів бактеріологічною петлею накопичувальної культури на поверхню агаризованому середовища в чашки Петрі. На першому етапі петлею з культурою наносять ряд паралельних штрихів на агаризованому середовищі (рис. 2.3, А). Петлю стерилізують, охолоджують і

проводять серію штрихів в напрямку, перпендикулярно першому (рис. 2.3, Б). Потім петлю знову стерилізують, охолоджують і штрихи наносять в напрямку В (рис. 2.3), а після чергової стерилізації – в напрямку Г (рис. 2.3). Чашки поміщають в термостат і через певний час враховують результати. Зазвичай на штрихах А і Б виростає велика кількість колоній (іноді суцільний ріст), тоді як на штрихах В і Г формуються ізольовані (окремі) колонії.

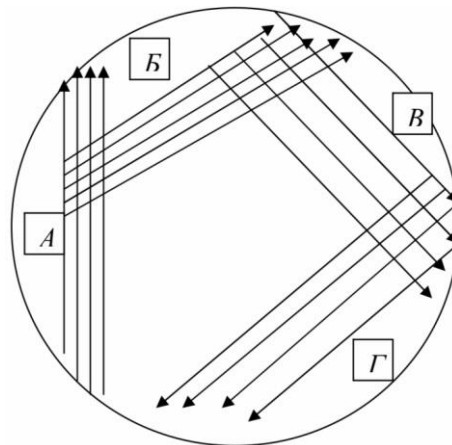


Рис. 2.3. Схема посіву мікроорганізмів штрихами для отримання ізольованих колоній

Послідовні розведення на твердому середовищі – найпростіший спосіб посіву на чашках, який полягає в тому, що після інокуляції проби в пробірку із стерильним розплавленим і охолодженим агаром, поживне середовище перемішують, виливають в чашку Петрі і дають застигнути.

Для отримання ізольованих колоній готують ряд послідовних десятикратних розведень і по 1 мл проб вносять відразу в чашку, додають 15-20 мл розплавленого агаризованому середовища і змішують, похитуючи чашку. Іноді окремі колонії виявляються зануреними в агар і мінус в тому, що мікроорганізми деякий час знаходяться в середовищі при температурі розплавленого агару.

Метод Пастера (метод граничних розведень) полягає в тому, що з досліджуваного матеріалу роблять ряд послідовних розведень в рідкому поживному середовищі.

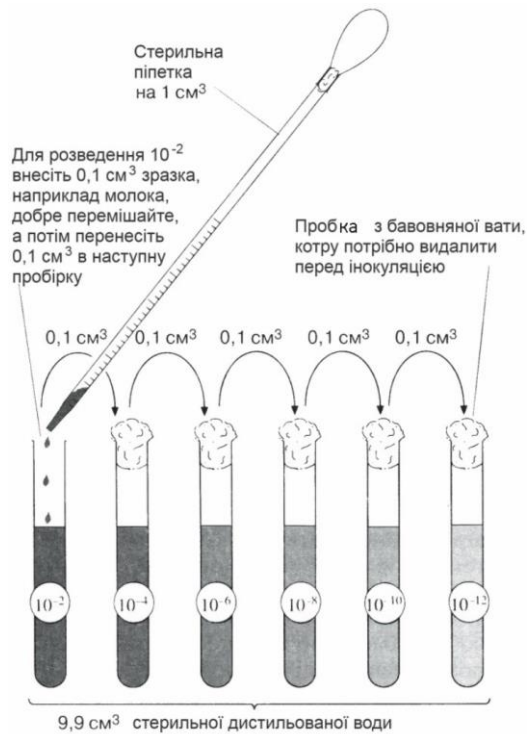


Рис.2.4. Приготування серійних розведень

Для цього краплю посівного матеріалу вносять в пробірку зі стерильною рідким середовищем, з неї краплю переносять у наступну пробірку і так засівають до 8...10 пробірок. З кожним розведенням кількість мікробних клітин, що потрапляють в середовище, буде зменшуватися і можна отримати таке розведення, в якому у всій пробірці з середовищем буде знаходитися тільки одна мікробна клітина, з якої утвориться чиста культура мікроорганізму. Тому в даний час цей метод використовується, головним чином, для попереднього зменшення концентрації мікроорганізмів у матеріалі перед посівом його в щільне середовище для одержання ізольованих колоній.

У роботі дріжджі *S.boulardii* виділяли методом граничних розведень, адже даний метод є більш точним, чашки з поживним середовищем ставили в термостат при температурі 32 °С. Після появи видимого росту дріжджів на поживному середовищі проводили ідентифікацію на основі їх морфолого-культуральних особливостей.

2.2.2. Визначення біомаси дріжджів *S.boulardii*

Існує декілька методів визначення біомаси дріжджів:

Нефелометричний (оптичний) метод визначення біомаси знайшов широке застосування в лабораторних мікробіологічних дослідженнях, оскільки дозволяє швидко і досить точно визначити концентрацію клітин в суспензії або культуральній рідині. У основі методу лежить вимірювання зменшення кількості світла при його проходженні через суспензію клітин. У певних межах воно обумовлене переважно розсіянням світла клітинами і пропорційно їх концентрації. Величина цього показника залежить від багатьох чинників (форми і розмірів клітин, оптичних властивостей культурального середовища, довжини хвилі падаючого світла і т. д.). Тому нефелометричний метод придатний лише для тих мікроорганізмів, накопичення яких викликає рівномірне помутніння середовища і не супроводжується помітною зміною форми і розмірів клітин, утворенням міцелію, плівок або інших скупчень [44].

Поживне середовище для культивування мікроорганізмів, в якому передбачається визначення числа клітин по світлорозсіюванню, повинне бути оптично прозорим. Якщо каламутність середовища пов'язана з випаданням в осад деяких солей, найчастіше фосфатів, то перед вимірюванням світлорозсіювання його підкислюють декількома краплями концентрованої соляної кислоти.

Біомасу дріжджів визначають за допомогою фотоелектрокалориметра (ФЕК-2) (рис. 2.5). На довжині хвилі $\lambda=540$ мкм, виділеної світлофільтром, вимірювали оптичну щільність розчину і потім по градуйованій кривій визначали концентрацію біомаси дріжджів.

Правила роботи на фотоелектроколориметрі та порядок вимірювання величини світлорозсіювання детально описані в інструкції, прикладеній до приладу. В світловий потік по черзі поміщають контрольну кювету з поживним середовищем, щодо якої проводять вимірювання і досліджувану кювету з дріжджовою суспензією. Фіксують показники реєструючого приладу в одиницях оптичної щільності. Вимірювання проводять по 3 рази, остаточне значення визнають як середнє арифметичне з отриманих значень. Для визначення концентрації біомаси

будується градуйована крива, для цього використовується ряд розчинів дріжджів з відомими концентраціями.



Рис.2.5. Фотоелектроколориметр «КФК-2»

Використовуючи ту ж кювету і на тій же довжині хвилі визначають оптичну щільність досліджуваної дріжджової суспензії і по градуйованій кривій знаходять концентрацію дріжджів в одиницях, г / л. Одержану залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат отримані дані з ФЕК, а на осі абсцис – кількість клітин, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л [44].

Ваговий метод визначення концентрації біомаси полягає у зважуванні відібраної проби в стаканчику на аналітичних вагах культуральної рідини $V = 25-30$ мл і чистого висушеного фільтру. Фільтрують культуральну рідину на воронці Бюхнера під вакуумом 600-700 рт. стовпа протягом 1 години. Після чого фільтр охолоджують в ексікаторі і зважують. Концентрацію біомаси вираховують за формулою [45]:

$$X = \frac{(A-B)100}{V}$$

де X – концентрація біомаси, г / л; A – вага фільтра з висушеною біомасою, г; B – вага фільтра; V – обсяг проби.

2.2.3. Визначення мертвих та зрілих клітин дріжджів *S.boulardii*

Морфологічний стан дріжджів визначають шляхом мікроскопування. З цією метою проводять підрахунок числа мертвих та живих клітин.

Визначення кількості мертвих клітин. Кількість мертвих клітин – важливий показник якості дріжджів. В дріжджах повинно бути не більше 5 % мертвих клітин. Збільшення кількості мертвих клітин вказує на наявність несприятливих факторів при вирощуванні дріжджів. При значній кількості мертвих клітин можливі порушення технологічного процесу: повільний процес біосинтезу, накопичення сторонніх видів мікроорганізмів. Перед підрахунком кількості мертвих клітин в культуральній рідині, визначали їх в готовому стерильному поживному середовищі і вираховували це значення з кількості мертвих клітин в культуральній рідині. Препарат готують наступним чином: на предметне скло наносили одну краплю досліджуваної проби і одну краплю метиленового синього, перемішували краєм покривного скла і накривали їм. На покривне скло наносили краплю іммерсійної олії і проводили мікроскопування зі збільшенням 90х. Мертві клітини фарбуються в синій колір, а живі залишаються безбарвними. Через 2-3 хвилини в 10 полях зору препарату підраховували кількість забарвлених клітин, обчислювали % вміст мертвих клітин:

$$X = B/A \times 100\%,$$

де А – загальна кількість клітин, В – кількість мертвих клітин [46].

Визначення кількості живих клітин в камері Горяєва. Кількість дріжджових клітин дріжджової суспензії визначали за допомогою лічильної камери Горяєва і мікроскопа. Для підрахунку кількості живих клітин робили розведення дистильованою водою так, що можна було порахувати клітини на сітці (не більше 10-15 клітин в одному квадраті сітки). Суспензію добре перемішували і заповнювали камеру, після чого її накривали покривним склом, що ретельно протирали. Надлишки вологи при цьому видаляли фільтрувальним папером. Клітини рахували в 5 великих квадратах. Розрахунок кількості клітин в 1 мл проби проводився за такою формулою:

$$Y = C/A \times 100\%,$$

де А – загальна кількість клітин, С – кількість живих клітин [47].

2.3. Висновки до розділу

Для отримання, культивування дріжджів *S.boulardii* були використані різні методи: морфологічні (дослідження морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей дріжджів), фізико-хімічні (виділення чистої культури дріжджів, дослідження ефективності різних джерел азоту на накопичення біомаси дріжджів, приготування поживних середовищ та інші), аналітичні (аналіз літературних джерел), математичні – обробка і розрахунок експериментальних даних (визначення мертвих та живих клітин).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Отримання чистої культури дріжджів *S.boulardii* з лікарського препарату «Нормагут»

У роботі дріжджі *S.boulardii* виділяли методом граничних розведень. Після появи видимого росту дріжджів на поживному середовищі проводили ідентифікацію на основі їх морфолого-культуральних особливостей. Морфологічне визначення клітин дріжджів проводили за допомогою мікроскопічного спостереження.

Морфологічні ознаки: клітини дріжджів даного виду мають овальну, округлу, яйцевидну або злегка видовжену форму, розміром 6-10 мкм.

Культуральні ознаки: колонії на поживному середовищі Рідера мали кремово-білий колір, круглої форми, з рівними краями і опуклим центром, з гладкою тускло-блискучою поверхнею, розміром до 10 мм (рис. 3.1). При зростанні на рідкому середовищі дріжджі цього виду утворюють невеликий осад жовтувато-білого кольору. Коли штам дріжджів був забарвлений барвником метиленовим синім спостерігали чітку бутонізацію колоній.

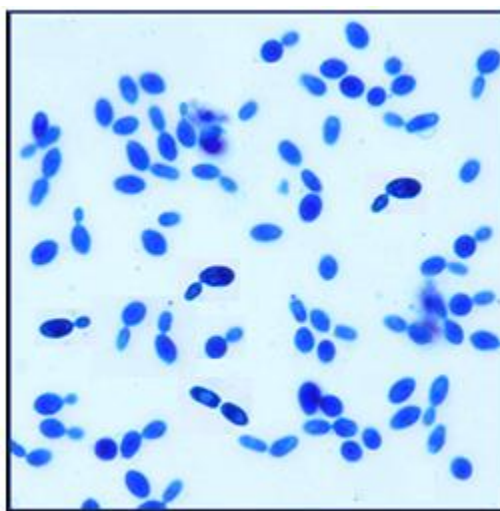


Рис. 3.1. Культура клітин дріжджів *S.boulardii*, $\times 600$

3.2. Розрахунок мертвих та зрілих клітин дріжджів *S.boulardii*

Визначення кількості мертвих клітин дріжджів *S.boulardii* проводили за допомогою фарбування зразка барвником метиленового синього. Метиленовий синій проникає в цитоплазму тільки через оболонку мертвих клітин, в результаті чого вони фарбуються в синій колір, тоді як живі клітини залишаються безбарвними. Підраховували кількість мертвих клітин шляхом додавання до однієї краплі досліджуваної проби однієї краплі метиленового синього. Потім визначали за формулою відсотковий вміст мертвих клітин:

$$X=(B/A)\times 100\% = (2/120)\times 100\% = 1,6\%$$

Мікроскопічне спостереження клітин дріжджів *S.boulardii* показав, що вміст мертвих клітин складав 1,6 % від загальної маси.

Визначення кількості живих клітин в камері Горяєва. Кількість клітин дріжджової суспензії визначали в лічильній камері Горяєва і за допомогою мікроскопа. Розраховували кількість клітин в 1 мл проби за такою формулою [47]:

$$X=(C/A)\times 100\% = (118/120)\times 100\% = 98,4\%$$

3.3. Порівняння ефективності біосинтезу дріжджів *S.boulardii* при додавання різних джерел неорганічного азоту

Для оптимізації складу поживного середовища і порівняння ефективності накопичення біомаси дріжджів *S.boulardii* було використано сім джерел неорганічного азоту: сульфат амонію, сечовину, гідроксид діамонію, цитрат амонію, нітрат амонію, хлорид амонію, нітрат калію. Як показано на рис. 3.2, після додавання вищезазначених семи неорганічних джерел азоту в поживне середовище Рідера, кількість життєздатних клітин та суха маса клітин дріжджів *S.boulardii* значно збільшилась, в порівнянні з контролем (поживне середовище без додавання джерела азоту).

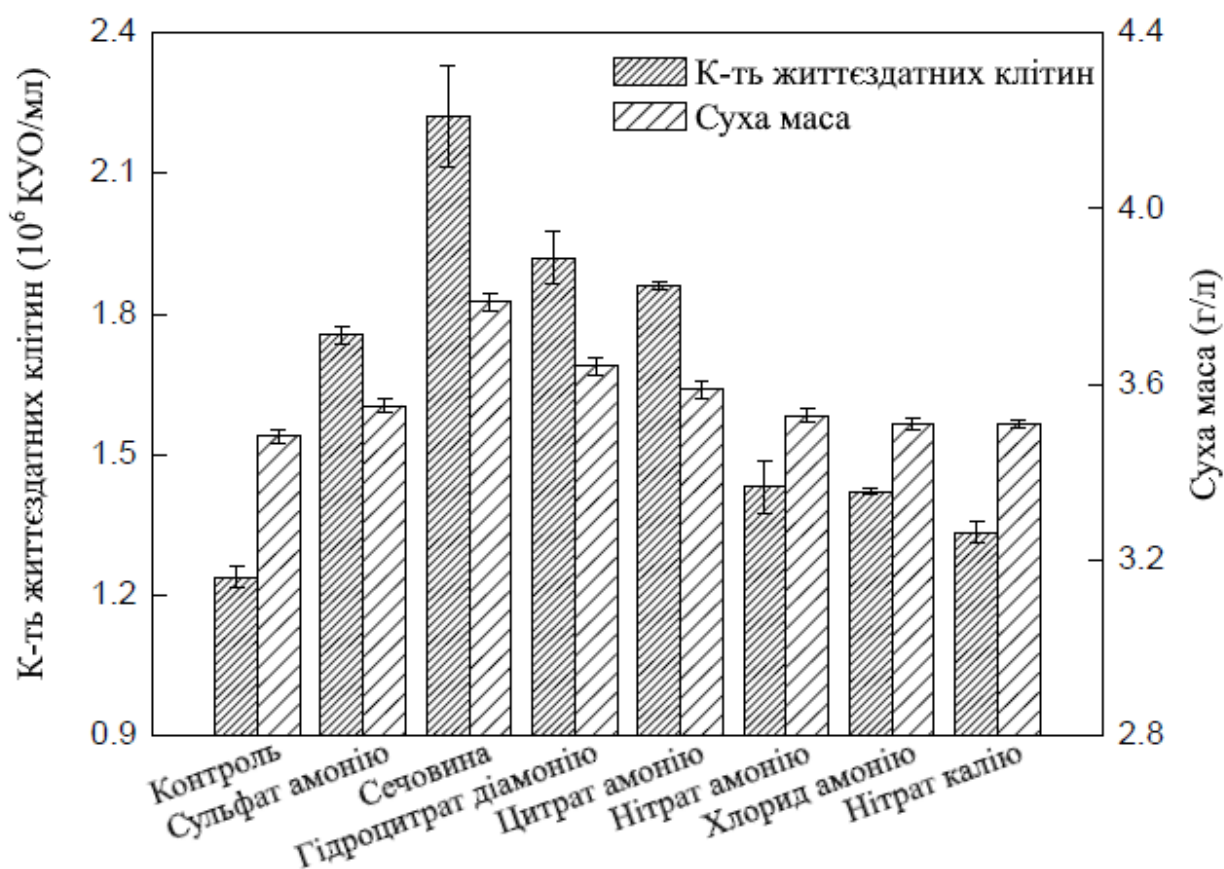


Рис. 3.2. Вплив неорганічних джерел азоту на ріст дріжджів *S. boulardii*

Різні неорганічні джерела азоту мали різний вплив на ріст клітин дріжджів. Вищезазначені результати показали, що додавання сечовини мало значний стимулюючий ефект під час росту дріжджів *S. boulardii*.

Для визначення найбільш підходящої концентрації сечовини вивчали динаміку росту дріжджів *S. boulardii* на поживному середовищі Рідера з додаванням різної масової частки сечовини (0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%). Як видно з графіку (рис. 3.3), кількість життєздатних клітин і маса сухих клітин спочатку збільшувались, а потім зменшувались із збільшенням концентрації сечовини.

Коли концентрація сечовини становила 0,4%, кількість життєздатних клітин досягла максимального значення $1,66 \times 10^6$ КУО / мл, маса сухих клітин становила 3,6922 г / л; крім того, значення рН культурального розчину суттєво не змінювалось

із збільшенням концентрації сечовини. Згідно з наведеними вище результатами: 0,4% сечовини було сприятливим для росту клітин [48].

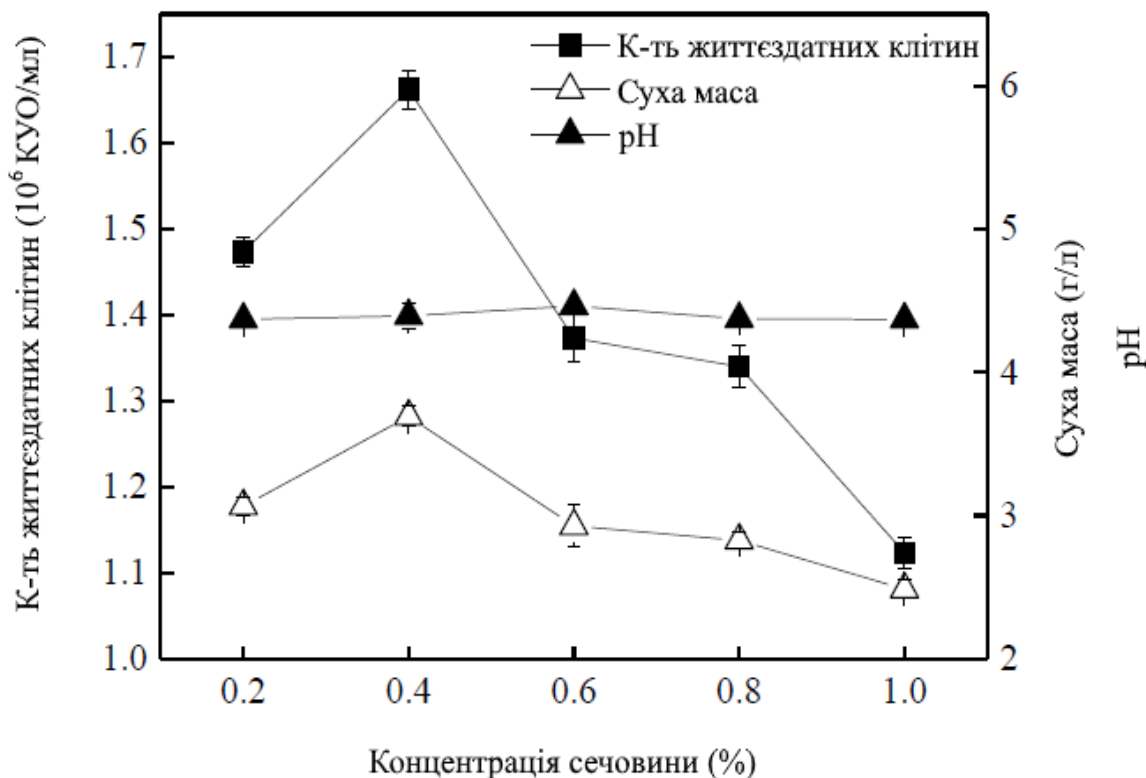


Рис. 3.3. Вплив сечовини різної концентрації на ріст дріжджів *S.boulardii*

Таким чином, до поживного середовища Рідера було внесено сечовину з концентрацією 0,4 % для задоволення ростових потреб дріжджів.

3.4. Підбір збалансованого поживного середовища для вирощування дріжджів *S.boulardii*

Аналіз технології виробництва пробіотичних препаратів показав, що важливим і перспективним напрямком є вдосконалення початкових – базових етапів виробництва, а саме створення максимально продуктивних умов накопичення біомаси – підбір та оптимізація складу поживного середовища.

Для культивування дріжджів [41] використовують традиційне поживне середовище. Недоліком такого поживного середовища є невеликий термін зберігання

та повільний ріст дріжджів, адже максимальна кількість дріжджів спостерігається тільки через 20-24 години культивування.

Нами запропоновано використовувати поживне середовище Рідера із додаванням джерела неорганічного азоту – сечовини, для підвищення біосинтезу біомаси дріжджів *S.boulardii*.

Таблиця 3.1

Склад поживного середовища для вирощування дріжджів *S.boulardii*

Компоненти поживного середовища	Вміст поживних речовин, г/л	
	Традиційне поживне середовище	Удосконалене поживне середовище
Сульфат амонію	3	3
Сульфат магнію	0,7	0,7
Нітрат кальцію	0,04	–
Хлорид натрію	0,5	0,5
Дигідрофосфат калію	1,0	1,0
Гідрофосфат калію	0,1	0,1
Агар	20	20
Сахароза	2	2
Сечовина	–	0,4

Для задоволення ростових потреб в поживне середовище додавали джерело неорганічного азоту в якості комплексного збагачувача – сечовину з концентрацією 0,4% (табл. 3.1). Накопичення біомаси дріжджів до концентрації 10^6 КУО/мл на удосконаленому поживному середовищі відбувається у 2 рази швидше ніж на традиційному (рис. 3.4). Однією із вагомих переваг запропонованого поживного середовища, на відміну від традиційного, є те, що його можливо заготовляти про запас.

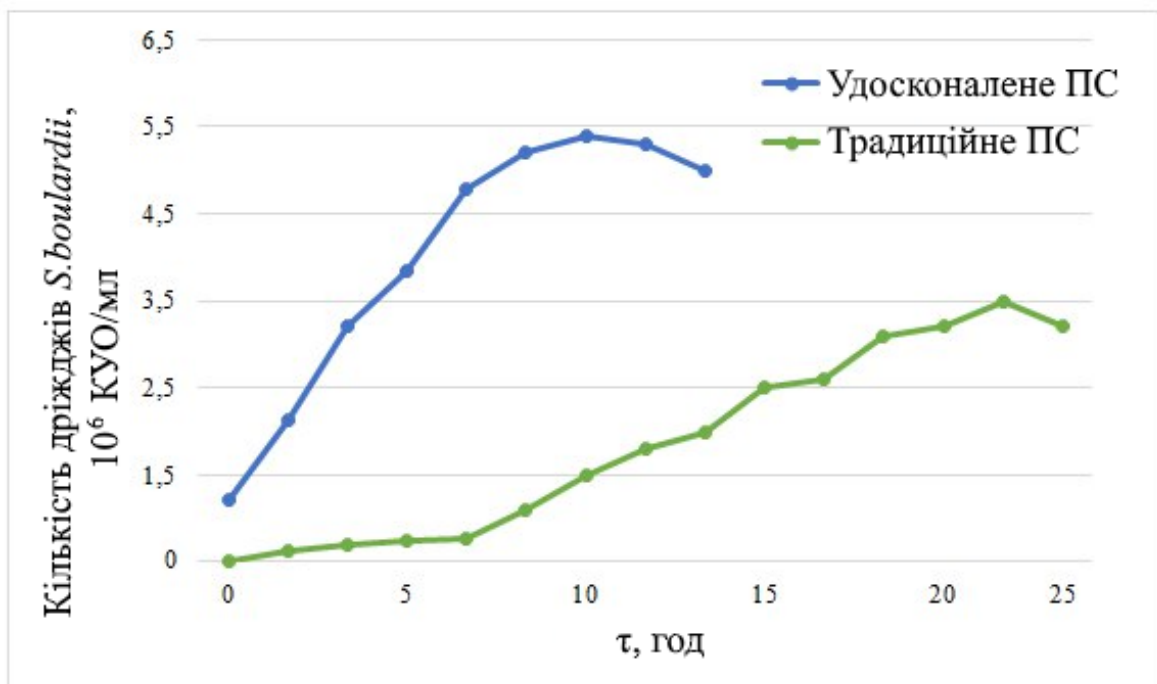


Рис. 3.4. Накопичення дріжджів *S.boulardii* при вирощуванні на традиційному та удосконаленому поживному середовищі з додаванням сечовини

Отже, запропоноване поживне середовище із додаванням сечовини володіє високими ростовими показниками. Накопичення біомаси дріжджів *S.boulardii* до концентрації 10^8 КУО/мл на цьому поживному середовищі відбувається протягом 8-10 год на відміну від традиційного середовища – 20-24 год.

3.5. Удосконалення технології отримання пробіотика «Нормагут»

Удосконалена принципово-технологічна схема отримання пробіотика «Нормагут» наведена у додатку Б, а традиційна технологічна схема наведена у додатку А. Пробіотики слід виробляти до правил належної виробничої практики – Good manufacturing practice (GMP). Незважаючи на різноманітність пробіотичних препаратів, їхнє виробництво передбачає два основних блоки робіт: допоміжні роботи і власне технологічних процес.

Технологічний процес охоплює приготування посівного матеріалу, виробничий біосинтез, одержання ліофілізованого напівпродукту (сублімаційне сушіння), суху масу подрібнюють і визначають кількість живих клітин для формування таблетки. Після цього здійснюють процес таблетування, зазвичай прямим пресуванням в асептичних умовах (вологість повітря не більше 50% за температури 18 °С). Наступною йде стадія пакування готової продукції, маркування і відвантаження. До допоміжних робіт належать: санітарна підготовка лабораторії, підготовка повітря, води фармакопейної якості, сировини та матеріалів (приготування поживного середовища).

Удосконалення технології отримання пробіотика «Нормагут» відбувається на стадії:

1. Підготовки поживного середовища (додавання до середовища в якості джерела неорганічного азоту – сечовини).
2. Процесу ферментації (підібрано новітнє обладнання);
3. Отримання біомаси дріжджів (скорочення часу культивування – від 24 до 8).

Під час контролю готових пробіотиків визначають кількість життєздатних клітин у дозі або ваговій одиниці препарату, яка має відповідати вимогам аналітичної нормативної документації (АНД) на конкретний препарат. Пробіотики не повинні містити сторонньої мікрофлори, допускається незначна кількість непатогенних мікроорганізмів.

Нешкідливість пробіотиків контролюють біопробою на лабораторних тваринах, яким вводять препарат перорально. Залишкова вологість ліофільно висушених препаратів не повинна перевищувати 3-5%, а сорбційних – 7-8%. У деяких випадках АНД передбачає визначення антагоністичної активності готового пробіотика щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів.

Отже, перевагами удосконаленої технологічної схеми проіотика «Нормагут» є: скорочення часу накопичення біомаси у 2 рази та висока життєздатність штаму дріжджів *S.boulardii* та колонізуючі властивості.

3.6. Висновки до розділу

Отже, було виділено чисту культуру дріжджів *S.boulardii* методом граничних розведень. Колонії мали кремово-білий колір, круглої форми, з рівними краями і опуклим центром, з гладкою тускло-блискучою поверхнею, розміром до 10 мм.

Підраховано кількість живих клітин дріжджів *S.boulardii* в лічильній камері Горяєва та шляхом мікроскопування, вона становить – 75%, а кількість мертвих клітин – 1,6 %. Таким чином визначали морфологічний стан дріжджів.

Виявлено, що найбільш ефективний біосинтез дріжджів на поживному середовищі спостерігається за використання в якості джерела неорганічного азоту – сечовини з концентрацією 0,4 %.

Удосконалено технологію біосинтезу пробіотика «Нормагут», що дозволяє скоротити час накопичення біомаси дріжджів у 2 рази. Встановлено, що для накопичення біомаси дріжджів доцільно використовувати поживне середовище Рідера з додаванням в якості джерела неорганічного азоту – сечовину, що володіє високими ростовими показниками.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Аналіз потенційно небезпечних та шкідливих виробничих факторів в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут»

При роботі в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» необхідно знати, які можуть виникнути потенційно небезпечні та шкідливі фактори. До потенційно небезпечних та шкідливих факторів у цій лабораторії можна віднести:

1. Підвищений рівень шуму на робочому місці в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут», який призводить до послаблення зосередженості та нервово-психічних розладів. Цей негативний виробничий фактор виникає в лабораторії внаслідок використання системи вентиляції, стерилізаційного обладнання (сушильної шафи, автоклаву), комп'ютера, шейкера тощо. Шум підвищеної інтенсивності (більше, ніж 50 дБА) протягом 2-х годин сприяє негативному впливу на органи слуху та організм людини в цілому, викликає серйозні захворювання, призводить до втрати працездатності, знижує продуктивність праці на 10-15%, значно погіршуючи її якість; порушує роботу центральної нервової системи (ЦНС).

2. Освітленість приміщень. Причиною перенапруги очей може бути недостатня освітленість робочої зони; необхідність розглядати дрібні колонії мікроорганізмів під мікроскопом, тощо. Зоровий дискомфорт може виникати через тривалу роботу за комп'ютером (6 годин робочої зміни) та з різними лабораторними приладами (мікропіпетками, бюретками), що потребують підвищеного зосередження [49].

3. Підвищений рівень ультрафіолетового випромінювання, джерелом якого є бактерицидні кварцові лампи, спектр яких містить діапазон випромінювання довжин хвиль від 205 до 315 нм. Ці електричні джерела випромінювання використовуються в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» для створення стерильних умов у боксі. Інтенсивність опромінення працівника становить $0,005 \text{ Вт/м}^2$ при загальній тривалості впливу 20 хв [49]. УФ-промені не лише згубно впливають на організм, а й

змінюють виробничий мікроклімат і склад повітря робочої зони. Утворюється озон, оксиди азоту, перекис водню, іонізується повітря. Внаслідок хімічної та іонізуючої дії УФ-випромінювання в атмосфері утворюються ядра конденсації, на яких розсіюються світло й освітленість робочих місць знижується. Через ці ефекти зростає несприятлива дія УФ-променів. Внаслідок надмірного впливу УФ-променів на організм виникає головний біль, втома, підвищення температури тіла.

4. Підвищений рівень електромагнітних випромінювань. Їх джерелами в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» є персональний комп'ютер, принтер, сканер, холодильник, електроплитка. Сучасні ПК випускають із захисними екранами, але це не вирішує проблеми впливу електромагнітного випромінювання на користувача. Робота за комп'ютером відбувалася по 8–10 год протягом доби. Дія електромагнітного поля на працівника з рівнем, що перевищує гігієнічну норму, може викликати функціональні порушення нервової, ендокринної та серцево-судинної систем [49].

5. Хімічні речовини, які застосовують для проведення дослідів у лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» можуть проникати в організм людини через органи дихання, шкірні покриви і слизові оболонки та негативно впливати на її стан. Хімічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори, що характеризуються токсичною (гідроксиди калію та натрію, аміак, етиловий спирт, солі калію та магнію, неорганічні сполуки фосфору, тощо), подразнюючою (дезінфікуючі та мийні засоби, азотомісткі сполуки, аміак), канцерогенною (ароматичні вуглеводні, біхромати), алергенною (антибіотики) діями.

Небезпека дії хімічних речовин пов'язана з тим, що при проведенні лабораторних досліджень виникає тісний контакт зі шкідливими, небезпечними, а також токсичними речовинами, які використовуються в якості реактивів. Відповідно ці хімічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори діють у концентраціях, що перевищують або дорівнюють гранично допустимим концентраціям шкідливих речовин у повітрі робочої зони, протягом 6 годин.

6. Температурний режим (мікроклімат). Тривалий вплив високої температури, особливо в поєднанні з підвищеною вологістю, може призвести до перегрівання

організму, коли температура тіла піднімається до 38-39 °С, викликаючи тепловий удар. При цьому спостерігаються головний біль, запаморочення, загальна слабкість, спотворення кольорового сприйняття, нудота, блювота, надмірне потовиділення [49].

Недостатня вологість повітря також може виявитися несприятливою для людини внаслідок інтенсивного випаровування вологи зі слизових оболонок, їх пересихання та розтріскування, а потім і забруднення хвороботворними мікробами. Дослідна робота, що виконуються в лабораторії при низькій температурі, великій рухливості і вологості повітря, може бути причиною охолодження і навіть переохолодження організму.

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних або шкідливих виробничих факторів в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут»

Заходи по боротьбі з шумом. Рівень шуму на робочому місці у лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» не повинен перевищувати передбачуваного – 50 дБА, згідно ДСН 3.3.6.037-99. Для зниження рівня шуму необхідне: здійснення акустичної обробки приміщення (облицювання всіх або частини внутрішніх поверхонь приміщення звукопоглинальним матеріалом); застосування засобів індивідуального захисту (використання навушників або застосування «берушей», які є гігієнічними та ефективними), екранування робочого місця (встановлення перегородок, діафрагм, які б забезпечували шумоізоляцію), використання обладнання, що несе мінімальний шум, раціональне планування приміщення [50].

Заходи, щодо освітленості приміщень. Лабораторія контролю якості пробіотика «Нормагут» повинна мати природне освітлення. Оптимальний рівень природного освітлення забезпечується при верхньому і боковому освітленні приміщення. Освітлення повинно бути рівномірним і не створювати блиску. Штучне освітлення приміщення може бути забезпечено люмінісцентними лампами та лампами розжарювання з відповідною арматурою, яка повинна давати розсіяне світло, бути безпечною та надійною. Рівень штучного освітлення у лабораторії при використанні

ламп розжарювання повинен складати 200-400 лк. Питома потужність люмінесцентного освітлення повинна бути 24-28 Вт/м², при лампах розжарювання – 48 Вт/ м². Для розрахунку питомої потужності необхідно скласти потужність всіх електричних ламп, які є в приміщенні та розділити на площу приміщення. Отриманий результат має відповідати зазначеним значенням вище [50].

Для профілактики захворювання очей у першу чергу необхідно звернути увагу на дотримання режимів праці та відпочинку. При роботі за ПК, необхідно враховувати правильне розміщення монітору (щоб центр екрана дисплея був нижчий від кута зору людини).

Заходи, від надмірного ультрафіолетового випромінювання. Для захисту від дії ультрафіолетового випромінювання необхідне використання захисних екранів: хімічні (речовини, креми, які поглинають УФВ) і фізичні (перешкоди, що поглинають або розсіюють промені). Очі слід захищати окулярами із захисним склом відповідно до ГОСТ 12.4.013-97. Для захисту також використовують спеціальний одяг та захисні ручні щити. 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 вхідних дверей [50].

Заходи, щодо захисту від несприятливого впливу електромагнітних випромінювань. Для захисту необхідно розташовувати джерела електромагнітних випромінювань так, щоб звести до мінімуму їх вплив на працюючих, встановити монітор ПК, що відповідає сучасним вимогам стосовно захисту від випромінювання; застосовувати засоби індивідуального захисту (халати, комбінезони із металізованої тканини та рідіопоглинаючих матеріалів, з виводом на заземлюючий пристрій). Для захисту очей доцільно користуватися окулярами ЗП5-90, скло яких вкрито напівпровідниковим оловом, що послаблює інтенсивність електромагнітних випромінювань.

Експлуатація бактерицидних установок повинна здійснюватися відповідно вимогам, вказаним в паспорті на виробі та інструкції з експлуатації. Бактерицидні лампи, що відробили термін служби, повинні бути замінені новими. Для цього необхідно вести облік часу роботи опромінювачів у лабораторії. До експлуатації бактерицидних установок слід допускати тільки персонал, що пройшов необхідний інструктаж з охорони праці. Лікарсько-профілактичні заходи передбачають проведення систематичних медичних оглядів працівників, які перебувають у зоні дії електромагнітного поля [49].

Заходи від хімічних речовин. Для захисту від шкідливої дії хімічних речовин при роботі у лабораторії необхідно дотримуватися правил охорони праці. Зниження рівня дії на працівника шкідливих та небезпечних речовин досягається шляхом проведення технологічних, санітарно-технічних, лікувально-профілактичних заходів (організація і проведення медичних оглядів, дихальної гімнастики, лужних інгаляцій), наприклад, забезпечення спецодягом, спецвзуттям і засобами індивідуального захисту, окремого приміщення для зберігання та приготування поживних середовищ, реактивів, робочих розчинів, оснащенням робочих місць витяжною вентиляцією тощо.

Захист від несприятливого впливу хімічних речовин у лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» здійснюється за допомогою таких заходів:

- Перед початком робіт проводити інструктаж на робочому місці.
- Влаштувати місцеву вентиляцію для відсмоктування шкідливих речовин безпосередньо від місця їх утворення.
- Дослід проводити тільки в захисному костюмі та спеціальному взутті з обов'язковим використанням засобів індивідуального захисту (респіратори, захисні окуляри, рукавички, шоломи, антисептичні пасти).
- Забезпечувати робоче місце необхідною кількістю води та нейтралізуючими речовинами.
- Регулярно проводити контроль за вмістом шкідливих речовин у повітрі робочої зони.
- Проводити токсикологічну експертизу і гігієнічну стандартизацію всіх

хімічних речовин.

Основою проведення заходів, щодо боротьби зі шкідливими хімічними речовинами є гігієнічне нормування. Гранично допустимі концентрації шкідливих речовин в повітрі робочої зони встановлені ГОСТ 12.1.005-88.

Відомо, що хімічні речовини при попаданні на тіло можуть викликати хімічні опіки, а проникнення в організм людини через легені, шкіру і рот – отруєння, глибоку токсикацію. Відповідно операції з концентрованими кислотами, лугами та іншими небезпечними речовинами слід проводити з використанням засобів індивідуального захисту (кислотостійкі рукавиці, окуляри та фартух) у витяжній шафі при працюючій загальнообмінній вентиляції.

При нагріванні рідини у пробірці необхідно спрямовувати її у бік від себе й осіб, які знаходяться поруч. При збовтуванні розчину у колбах і пробірках треба закривати їх тільки пробками. При закупорюванні пробками посудин із реактивами враховують їх властивості. Гумові пробки сильно набухають під дією деяких реактивів (спирт, ацетон, ефір), а під дією галогенів (бром, йод) втрачають еластичність. Такі реактиви краще закупорювати скляними притертими пробками. Луг не можна закупорювати притертою пробкою, тому що карбонати, що утворюються між пробкою і горлом, щільно заклинюють пробку.

Відбір кислот, лугів та інших агресивних рідин з великих ємностей слід проводити за допомогою скляних сифонів з грушею або інших приладів для їх перекачування, забороняється набирати концентровані кислоти і луги в піпетки ротом.

При приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім помалу додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту. Розведення кислот проводять тільки в термостійкому посуді. При митті посуду хромовою сумішшю запобігають попаданню її на шкіру, одяг, взуття [24].

Заходи, щодо підтримки мікроклімату в лабораторії. Для підтримки нормативних параметрів мікроклімату в лабораторії повинні функціонувати якісні системи вентиляції та опалення. Для захисту працівників лабораторії всі апарати, що виділяють велику кількість тепла, повинні бути покриті теплоізоляційними

матеріалами. Завдяки застосуванню систем вентиляції та кондиціонування значно поліпшуються умови повітряного середовища у приміщенні. Для здійснення вентиляції в приміщенні застосовують загальнообмінні системи – як припливні, так витяжні. Загальнообмінні витяжні системи відносно рівномірно видаляють забруднене повітря з усього приміщення і розподіляють чисте повітря по всьому об'єму в лабораторії.

Розрахунок системи витяжної вентиляції в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут»: одним з основних заходів щодо зниження рівня впливу на працівника лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» шкідливих та небезпечних хімічних речовин та мікроорганізмів є забезпечення робочих місць витяжною вентиляцією, що видаляє шкідливі домішки в повітрі.

При розрахунку місцевої витяжної вентиляції кількість повітря, що вилучається витяжною шафою, можна розрахувати за формулою:

$$L = F \cdot v \cdot 3600, (\text{м}^3 / \text{год}),$$

де F – площа перерізу отвору місцевої витяжки, м^2 ;

v – швидкість руху вилученого повітря в цьому отворі (приймається від 0,5 до 1,7 м/с в залежності від токсичності та леткості газів і парів) [49].

Визначаємо площу перерізу отвору місцевої витяжки:

$$F = 3,14 \cdot (0,25)^2 / 4 = 0,05 (\text{м}^2)$$

Підставляємо отримані значення до формули:

$$L = 0,05 \cdot 0,80 \cdot 3600 = 144 (\text{м}^3 / \text{год})$$

Отже, для забезпечення нормального вентиляювання та циркулювання повітря в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» необхідно мати потужність місцевої витяжної вентиляції $144 \text{ м}^3 / \text{год}$.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут»

Загальні вимоги до систем запобігання пожеж і пожежного захисту регламентуються міждержавними стандартами системи стандартів безпеки праці

НАПБ А.01.001-2004 і спеціальною нормативною документацією.

Аналіз причин пожежі. Причини пожеж в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» можуть бути такі:

- необережне поводження з вогнем (залишення без нагляду електронагрівальних приладів, недбале проведення робіт з вогнем та ін.);
- несправний пристрій, чи порушення режиму системи опалення, вентиляції і кондиціонування повітря;
- перевантаження електричних установок (порушення правил їх експлуатації) і мереж;
- samozapalювання і samozаймання речовин і матеріалів при неправильному їхньому збереженні чи застосуванні;
- невиконання вимог нормативних документів з питань пожежної безпеки тощо.

Приміщення лабораторії повинно бути забезпечене автоматичною пожежною сигналізацією, схемою евакуації, вогнегасниками, які розташовують у доступних місцях. Бокс та приміщення, в яких розміщені сушильно-стерилізаційні шафи і термостати, забезпечують вогнегасником та вовняною ковдрою. Забороняється розміщувати на сушильно-стерилізаційних шафах і термостатах та біля них сторонні предмети, вибухонебезпечні, легкозаймисті, горючі, токсичні та агресивні речовини. Підходи до засобів пожежогасіння повинні бути вільними.

Для попередження виникнення пожежі в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» забороняється:

- працювати з лужними металами у лабораторії з високою вологістю та допускати їх контакт з водою, хлоровмісними органічними сполуками;
- використовувати відкритий вогонь, палити в лабораторії, окрім спеціально відведених місць;
- користуватися витяжними шафами з розбитим склом або несправною вентиляцією, а також шафами, в яких є речовини, матеріали та устаткування, які не потрібні для конкретного дослідження;
- залишати та зберігати вату, марлю, спирт та інші легкозаймисті речовини та

матеріали на шафах та поза ними, на радіаторах центрального опалення, поблизу палаючих пальників, електричних проводів і приладів;

– у разі аварії забороняється виливати легкозаймисті речовини та горючі рідини у каналізацію;

– встановлювати витяжні шафи без дозволу адміністрації. Не допускається, щоб витяжна шафа встановлювалася безпосередньо біля дверей;

– зберігати легкозаймисті, вибухові та вогненебезпечні речовини без дотримання правил безпеки;

– нагрівати легкозаймисті речовини на відкритому вогні, електроплитах тощо;

– залишати без нагляду включені електроприлади, електричне освітлення, запалені газові пальники;

– користуватися електроплитами, та іншими електронагрівальними приладами там, де не передбачено технологічними процесами;

– прибирати випадково пролиті легкозаймисті речовини при запалених пальниках і включених електроприладах;

– захарашувати евакуаційні шляхи та підступи до засобів пожежогасіння;

– користуватися несправними або з відкритою спіраллю електронагрівальними приладами;

– влаштовувати тимчасові електромережі, прокладати кабелі та електропроводи безпосередньо по горючій основі тощо [50].

У лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» повинні бути наявні інструкції з пожежної безпеки, з обслуговування установок пожежогасіння, установок пожежної сигналізації, датчики диму, оперативні картки дій на випадок виникнення пожежі, схема евакуації людей на випадок пожежі, встановлена система оповіщення людей про пожежу, плани та графіки проведення протипожежних тренувань, навчання і перевірки знань персоналу, тощо.

У разі виявлення пожежі або її ознак (задимлення, запах горіння або тління матеріалів тощо), необхідно:

– оцінити обстановку і повідомити про це в найближчий пожежно-рятувальний підрозділ за тел.101. При цьому необхідно назвати: адресу об'єкта, вказати кількість

поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, наявність людей і повідомити своє прізвище;

- задіяти систему оповіщення людей про пожежу;

- викликати пожежну охорону, при необхідності здійснюється евакуація людей згідно з діючим планом евакуації;

- організувати відключення мереж електро- та газопостачання;

- вимкнути системи вентиляції та кондиціонування повітря і здійснення інших заходів, які сприяють запобіганню поширенню пожежі;

- розпочати гасіння пожежі своїми силами з допомогою наявних засобів пожежогасіння;

- організувати зустріч пожежно-рятувальних підрозділів [50].

4.4. Висновки до розділу

Отже, в лабораторії контролю якості пробіотика «Нормагут» можуть діяти різні шкідливі фактори і важливо знати організаційні та технічні заходи для їх запобігання. Було визначено, що для забезпечення нормального циркулювання повітря в лабораторії необхідно мати потужність місцевої витяжної вентиляції 144 м³ /год.

Лабораторія повинна бути забезпечена первинними засобами пожежогасіння: вогнегасниками, пожежним інвентарем: пожежними щитами та стендами, пожежними відрами, пожежним знаряддям та засобами зв'язку.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Характеристика осадів стічних вод, як джерела екологічної небезпеки при дріжджовому виробництві

Стічні води (СВ) – це води, що відводяться від виробничих об'єктів. Для складу стічних вод характерною ознакою є значна різноманітність. Так, у цих водах можуть домінувати лише неорганічні домішки, а в інших – органічні. Вони можуть містити компоненти, які сприяють розвитку бактерій і мікробів чи, навпаки, пригнічують їх життєдіяльність. Недостатнє очищення стічних вод нерідко призводить до утворення шламу, який при надходженні у водний об'єкт негативно впливає на його екологічний стан. Нерозчинні речовини стічної рідини можуть викликати утворення донних відкладів – мул. Крім того, деякі органічні речовини сприяють появі у водному об'єкті різних мікроскопічних грибів, що знижує якість води. При отриманні пробіотика «Нормагут» споживається велика кількість води та повітря, які забруднюються мікроорганізмом-продуцентом, органічними та мінеральними речовинами [51].

Осади стічних вод (ОСВ) утворюються в результаті очищення стічних вод дріжджового виробництва на очисних спорудах, це відбувається унаслідок випадання нерозчинних речовин у первинних відстійниках вивільнення стічних вод після біологічного очищення від надлишкового мулу і твердих завислих часточок у вторинних відстійниках. До осадів відносяться всі домішки (нерозчинені і розчинені), затримані головним чином первинними і вторинними відстійниками, флотаційними, фільтраційними та іншим обладнанням після механічного, біологічного і фізико-хімічного очищення [51].

У процесах механічної, хімічної, біологічної та фізико-хімічної очистки стічних вод на очисних спорудах утворюються різного виду осади, що містять органічні і мінеральні компоненти. Залежно від способу очищення, а також від фазово-дисперсного стану домішок розрізняють осади *первинні* і *вторинні*. До первинних

осадів відносяться грубодисперсні домішки, які перебувають у твердій фазі та виділені з води методами механічного очищення (седиментація, фільтрація, флотація, осадження у відцентровому полі). До вторинних осадів відносяться домішки, що перебувають у воді у вигляді колоїдів, молекул, іонів, які можуть бути переведені у тверду фазу і вилучені зі стічної води лише в результаті біологічного і фізико-хімічного очищення.

Склад осадів за розміром частинок відрізняються великою неоднорідністю. Їх розміри коливаються від 10 мм і більше до частинок колоїдної і молекулярної дисперсності.

Первинні осади поділяються на:

- грубі, переважно органічного походження, які затримують ґратами;
- важкі, що складаються з піску, уламків мінералів і т.п., які осідають в піскоуловлювачах;
- плаваючі, затримуються жироловками, відстійниками;
- сирі (від 75% до 80% органічних речовин), виділяються у первинних відстійниках.

До вторинних осадів відносяться:

- активний мул з вторинних відстійників, що представляє собою тонку суспензію, що складається в основному з частинок менше 1 мм, з вологістю від 99,2% до 99,7%;
- шлами, що виділяються в результаті локального очищення або доочищення стічних вод фізико-хімічними методами;
- зброжені в анаеробних умовах осади дрібної і однорідної структури;
- осади з аеробних стабілізаторах, які ущільнюються у відстійниках за 5-15 год до вологості від 96% до 98%, що потребують знезараження.

Обов'язковою умовою ефективної роботи очисних споруд є обробка і видалення ОСВ з метою екологічно безпечного використання або зберігання осадів. Незважаючи на те, що осади стічних вод відносять до мало небезпечних відходів (IV клас), наслідки їх зберігання створюють екологічні, економічні і соціальні проблеми. Більшість умов, необхідних для нормальної експлуатації місць зберігання ОСВ не

виконуються. Заходи по сортуванню і знешкодженню ОСВ не проводяться [51]. Перебуваючи на мулових майданчиках і в ставках, ОСВ займають великі площі родючих земель (253 тис. м²), які виведені із виробничого обороту під розміщення основного виду відходів очисних споруд, а також вимагають постійного здійснення екологічного моніторингу та контролю [51].

Осади стічних вод забруднюють ґрунт, поверхневі і підземні води, атмосферу. Забруднення навколишнього середовища ОСВ відбувається в результаті емісії цілого ряду хімічних елементів (органічні речовини, сполуки азоту і фосфору, важкі метали та інші елементи), що містяться в даному виді відходів.

Згідно з літературними даними [51], високий вміст важких металів при надходженні до підземних вод, які відносяться до категорії «незахищені», простежується в декількох геологічних горизонтах (на глибині 5-6 м), при цьому суттєву частку балансу підземних вод становить інфільтрат з мулових майданчиків.

Особливу небезпеку для поверхневих вод (які знаходяться на відстані 0,05 км та 2 км від розташування місць зберігання ОСВ), при незадовільній роботі мулових майданчиків, являє надходження забруднюючих речовин с дренажними водами, що практично зводить нанівець ефективність роботи очисних споруд. При тривалому зберіганні ОСВ на мулових майданчиках, в результаті анаеробних процесів розкладання, відбувається емісія біогазу і забруднення атмосфери.

Більшість мулових майданчиків щодо заповнення підходять до межі своїх проектних потужностей, і вимагають нових площ для розміщення осадів, що пов'язано з фінансовими стягненнями за розміщення відходів і деградацією нових територій, зайнятих під мулові майданчики і ставки.

Складування ОСВ в безпосередній близькості від виробничих підприємств на відстані 2 км, створює передумови для несанкціонованого використання їх в якості добрива і, як наслідок, до забруднення додаткових площ земель. Осади стічних вод є сприятливим бактеріологічним середовищем для розвитку різних паразитарних агентів (яйця та личинки гельмінтів, цисти кишкових найпростіших), а бездомні тварини і птахи, будучи переносниками небезпечних інфекцій (токсокароз), створюють епідеміологічні несприятливі ситуації [51].

На підставі вищенаведеного, необхідно розробити заходи, які дозволять утилізувати осади стічних вод, і таким чином знизити їх негативний вплив на стан навколишнього природного середовища, виконати екологічні нормативи щодо поводження з відходами та забезпечити екологічну безпеку при експлуатації досліджуваного підприємства.

5.2. Поводження з осадами стічних вод при виробництві пробіотика «Нормагут»

Обробка осадів стічних вод при виробництві пробіотика «Нормагут» складається з наступних стадій: ущільнення або згущення, стабілізація, кондиціонування, зневоднення, термічна сушка, знезараження, ліквідація, утилізація. Вибір методів стабілізації, зневоднювання та знезараження осадів стічних вод (ОСВ) визначається виробничими умовами. Для підвищення концентрації активного мулу при одночасному ущільненні ОСВ і надлишкового активного мулу рекомендується застосування мулоущільнювачів гравітаційного типу (радіальних, вертикальних, горизонтальних), флотаторів і згущувачів [51].

Для анаеробного зброджування осадів стічних вод з метою стабілізації дріжджового виробництва застосовують метантенки. Допускається також подача разом з осадами інших органічних подрібнених речовин, які зброджуються (відходи органічного походження). Для зброджування осадів у метантенках застосовується мезофільний або термофільний режим.

Неущільнений або ущільнений протягом не більше 5 год активний мул, а також його суміш із осадом аеробно стабілізуються на спорудах типу коридорних аеротенків. Аеробна стабілізація може здійснюватися в діапазоні температур від 8 до 35 °С. Для осадів стічних вод тривалість процесу визначається експериментально. Ущільнення аеробно стабілізованого осаду рекомендується здійснювати в окремих мулоущільнювачах або спеціально виділеній зоні у стабілізаторі протягом не більше

5 год. Вологість ущільненого осаду має бути від 96,5 до 98,5%. Мулова вода з ущільнювачів подається в аеротенки.

Якщо осади стічних вод підлягають механічному зневодненню, то попередньо вони обробляються – ущільнюються, промиваються (зброджений осад), коагулюються хімічними реагентами. Необхідність попередньої обробки осадів виробничих стічних вод визначається експериментально. Для ущільнення суміші води промитого осаду і води застосовуються ущільнювачі, розраховані на 12-18 год перебування в них суміші при мезофільному зброджуванні і на 20-24 год термофільному режимі. Як реагенти при коагулюванні осадів стічних вод застосовується хлорне залізо або сірчаноокисне окисне залізо і вапно у вигляді 10 %-х розчинів. Механічне зневоднювання здійснюється на вакуум-фільтрах безперервно діючих горизонтальних центрифуг. Мулові майданчики влаштовуються на природній основі з дренажем і без нього, на штучній асфальтобетонній основі з дренажем, каскадні з відстоюванням і поверхневим відведенням мулової води, майданчики-ущільнювачі. З мулових майданчиків вода подається на очисні споруди [51].

Осад підлягає знезараженню в рідкому вигляді, після підсушування на мулових майданчиках або механічного зневоднювання. Знезараження і дегельмінтизація сирих, мезофільно зброджуваних осадів здійснюється шляхом їх прогрівання до 60°C та витримуванням не менше 20 хв за розрахункової температури. Необхідність термічного висушування осаду визначається умовами подальшої утилізації та транспортування. Перед подачею на висушування здійснюється максимально можливе зневоднювання осаду з метою зменшення енергоємності процесу. Вологість висушеного осаду має становити від 30 до 40%.

Для зберігання механічно зневодненого осаду влаштовують відкриті майданчики з твердим покриттям. Висота шару на майданчиках може становити від 1,5 до 3,0 м. Для неутилізованих осадів рекомендуються споруди, які б забезпечували їх складування в умовах, що запобігають забрудненню навколишнього середовища [51].

5.3. Методи очистки стічних вод при виробництві пробіотика «Нормагут»

Накопичення значних об'ємів осадів стічних вод (ОСВ) на обмеженій площі очисних споруд (ОС) при виробництві пробіотика «Нормагут» ускладнює їх експлуатацію і створює реальну загрозу заруднення навколишнього середовища (повітряного природного середовища, поверхневих та підземних вод). Для уникнення забруднень навколишнього середовища необхідно очищати стічні води. Методи очищення стічних вод можна розділити на: механічні, фізико-хімічні, хімічні та біологічні. Застосування того чи іншого методу в кожному конкретному випадку визначається характером забруднення і ступенем шкідливості домішок. На рис. 5.1 представлені методи очищення стічних вод, які широко застосовуються.



Рис. 5.1. Найбільш поширені методи очищення стічних вод

Суть механічного методу очищення полягає в тому, що із стічних вод шляхом відстоювання і фільтрації видаляються механічні домішки. Цей метод очистки стічних вод є найбільш дешевим.

Грубодисперсні частки в залежності від розмірів уловлюються ґратами, ситами, пісколовками, септиками, а поверхневі забруднення – нафтопастками, відстійниками. Механічне очищення дозволяє виділяти до 60-75% нерозчинних домішок [51].

ґрати використовуються для затримання найбільш крупних плаваючих відходів, які можуть перешкодити відокремленню шламу та його обробці, ускладнити перекачування стічних вод. Піскоуловлювачі призначені для вивільнення стічної

води від важких завислих мінеральних речовин: піску, сажі, іншого бруду тощо. Піскоуловлювачі відокремлюють пісок та гравій від більш легких осадів. Це дуже важливо, оскільки пісок забиває насоси та трубопроводи, мінеральним баластом, ускладнюючи його вилучення з відстійників. Роль сит зводиться до відокремлення на місці утворення стічних вод дрібних завислих речовин, які можуть бути повторно використані та вилучені.

Для очищення стічних вод від дуже маленьких частинок застосовують фільтрування. Застосовують тканинні або мембранні фільтри. Фільтри працюють за принципом сітчастих барабанів, робоче полотно яких – це повстяна стрічка, яка рухається разом з ними. Фільтри встановлюються після відстійників. Відстійники використовуються для осадження і вилучення із стічної рідини речовин, що перебувають у грубодисперсному стані, здебільшого органічного походження [52].

Флотаційні установки використовуються у випадках, коли нерозчинні речовини в стічній рідині практично не відстоюються. Ці речовини штучно скаламучуються у воді, приєднуються до повітряних бульбашок і виносяться ними на поверхню води з утворенням пінистого шару, який і вилучається. Флотація надає можливість повертати у виробництво цінні речовини. При цьому у воду додають спеціальні речовини-піноутворювачі, які знижують поверхневий натяг води. Тим самим це сприяє сильному прилипанню бульбашок повітря до завислих домішок.

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 інших випадках механічна очистка слугує першим етапом очистки стічних вод [52].

Фізико-хімічний метод очищення полягає в тому, що у стічні води вводять речовину-реагент (коагулянт чи флокулянт). Вступаючи в реакцію з домішками, які знаходяться у воді, ця речовина сприяє повному видаленню нерозчинних домішок, колоїдів. Найчастіше застосовують з фізико-хімічних методів: евапорацію, екстракцію, сорцію та аерацію [52].

Евапорація (відгонка з водяною парою): очищення стічних вод шляхом евапорації полягає у відгонці з водяною парою летких забруднювальних органічних

речовин, наприклад фенолів. Пара, що пройшла евапораційну колонку, надходить до скрубера, в якому звільняється від захоплених забруднювальних речовин.

Екстракційний метод очищення полягає в обробці стічних вод певним розчинником, що не змішується з водою (екстрагентом), у якому забруднювальні домішки достатньо добре розчинні. Домішки, які усуваються в результаті екстракційного очищення, як правило, є органічними речовинами. Як екстрагенти частіше використовуються органічні розчинники (бензол, чотирихлористий вуглець, мінеральні масла тощо).

Аерація забезпечує або ж десорбцію розчинених домішок (перехід у газову фазу), або ж окиснення домішок і переведення їх у стан, який є сприятливим для вилучення з води.

Вирізняють сорбцію у статичних умовах, яка здійснюється уведенням подрібненого сорбенту у стічну рідину. Існує також сорбція в динамічних умовах, яка здійснюється фільтруванням води через шар сорбенту (вугілля, торф, каолін, стружка тощо).

Хімічними методами очищення є нейтралізація та коагуляція. Нейтралізація є важливим хімічним способом загального процесу регулювання значення рН. Її завдання – доведення реакції стічної рідини до нейтральної. Для нейтралізації кислих вод використовують як розчинні, так і слабозчинні у воді реагенти. До перших належать: вапно, сода; до других: оксид та гідроксид магнію, карбонати кальцію та магнію.

Коагуляція використовується для прискорення процесу усунення розчинних домішок. У стічну воду додаються коагулянти (сульфат амонію, сульфат окисного і закисного заліза, хлорне залізо та ін.). Коагулянти виділяються з розчину, утворюючи колоїдні частинки, які укрупнюються в результаті взаємного злипання. При цьому укрупнюються більш чи менш великі пластівці, що випадають в осад разом з колоїдними і тонкодисперсними завислими речовинами, які забруднюють стічну воду. Після цього відбувається вилучення з рідини утворених агрегатів, які осіли на дні відстійника [52].

Біологічні методи очищення. Біологічні методи найкраще освоєні і досить економічні. Застосовують їх в основному для очищення стічних вод від органічних домішок. Засновані на здатності мікроорганізмів використовувати в якості харчування органічні та деякі неорганічні сполуки, які містяться в стічних водах. Частина цих речовин йде на синтез біомаси, а частина перетворюється в нешкідливі продукти окислення: CO_2 , H_2O та ін. Біологічну очистку можна проводити в аеробних (поля фільтрації, біологічні ставки, аеротенки) і анаеробних (метантенки) умовах [52].

Біологічне очищення має такі переваги, обумовлені особливостями життєдіяльності мікроорганізмів:

- видаляється широкий спектр органічних і неорганічних з'єднань, в тому числі токсичних;
- утворення простих кінцевих продуктів, основні з яких діоксид вуглецю, нітрати, сульфати;
- відсутність вторинного забруднення води.

Біологічні методи очищення стічних вод полягають у розкладанні та мінералізації аеробним чи анаеробним шляхом колоїдних і розчинених у стічних водах органічних речовин, які не можна вилучити механічним шляхом. Найкращою умовою біологічного очищення стічних вод було б повне відокремлення мінеральних сполук від органічних, але це технічно неможливо. Тому на практиці обмежуються відокремленням значних домішок стічних вод на решітках; великодисперсних домішок неорганічного походження – у піскоуловлювачах та основної кількості завислих речовин – у відстійниках. Після цього стічна рідина надходить на споруди біологічного очищення. При цьому рідинна фаза органічних речовин стічних вод розкладається аеробним шляхом (за наявності кисню), а тверда фаза (ОСВ) – анаеробним шляхом (за відсутності кисню) [52].

Очисними спорудами при біологічному методі очищення є: біологічні фільтри (споруди, заповнені великозернистим ненабрякаючим матеріалом, поверхня якого зрошується стічною рідиною), аеротенк (споруда, в якій здійснюється біологічне очищення освітлених у відстійнику стічних вод з більшою інтенсивністю).

Очищення стічних вод при виробництві пробіотика «Нормагут». Одним з найважчих видів стічних вод для очищення є стік від дріжджового виробництва. Це пов'язано з високим вмістом біохімічної потреби в кисні (БПК) та хімічної потреби в кисні (ХПК) в таких водах, і як наслідок необхідності застосування двоступеневої біологічної очистки. Так, наприклад, стічні води дріжджового виробництва вважаються дуже багатими органічними речовинами. Крім цього вони характеризуються підвищеними концентраціями сульфатів, сполук фосфору, азоту і присутністю живих клітин дріжджів. рН-середовище таких вод – кисле. Присутній неприємний запах.

Вода забруднюється цими речовинами під час виробництва пробіотика «Нормагут», продуцентом якого є дріжджі. Процес полягає в наступному: дріжджі виділяють з культурального середовища, промивають водою, згущують за допомогою сепараторів і відокремлюють від рідини на вакуум-фільтрах. Найбільша концентрація солей і дріжджових клітин міститься в стічних водах, що утворюються після сепарації.

Очищення стічних вод дріжджового виробництва має багато варіантів в залежності від технології виготовлення дріжджів (а також від їх виду: харчові, хлібні, товарні).

Класична схема локальних очисних споруд виробництва пробіотиків, в яких як біологічний агент – дріжджі: решітки, піскоуловлювачі, первинні відстійники, усереднювач, метантенк, вторинні відстійники, змішувач, аеротенк першого ступеня, третинні відстійники, аеротенки другого ступеня, четвертинні відстійники (може застосовуватися регенератор), біологічні ставки, цех знезараження, контактний резервуар, випуск у водойму. Часто вода після такої очистки використовується повторно на виробництві (оборотне водопостачання).

5.4. Висновки до розділу

Встановлено, що в процесі дріжджового виробництва утворюється значна кількість забрудненої води з осадами, забруднене повітря, що містить в собі

мікроорганізми, органічні та мінеральні речовини, що згубно впливають на навколишнє середовище.

Досліджено, що в наш час застосовуються різні методи очищення забруднених стічних вод: механічні методи, хімічні, фізико-хімічні методи, біологічні методи (анаеробний та анаеробний). Для очищення стічних вод від дріжджового виробництва 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.

З метою уникнення негативного впливу на навколишнє середовище необхідно запровадити заходи по сортуванню і знешкодженню осадів стічних вод, здійснення постійного екологічного моніторингу та контролю, проектування нових площ для їх розміщення. А у лабораторії виробництва пробіотика «Нормагут» слід дотримуватись технічних, санітарно-технічних, заходів індивідуального захисту з метою профілактики негативного впливу бактерій на організм людини.

ВИСНОВКИ

1. Охарактеризовано пробіотик «Нормагут» та біологічний продуцент – дріжджі *S.boulardii* і з'ясовано, що вони продукують ряд вторинних метаболітів нутрицевтиків, в тому числі антиоксидантів, які позитивно впливають на здоров'я людини. З'ясовано, що результати багаторічного застосування мікроорганізмів *S.boulardii* свідчать про безпечність цих дріжджів і ефективність їх використання для попередження і лікування деяких захворювань шлунково-кишкового тракту. Завдяки комплексній антимікробній та антитоксичній дії пробіотичний препарат «Нормагут», що містить у своєму складі ці дріжджі, рекомендований для терапії діареї різного генезу у дорослих і дітей. Трофічна, імуномодулююча і стимулююча дія даного пробіотика допомагає подолати наслідки антибіотикотерапії, бактеріальних, протозойних і вірусних інфекцій.

2. Досліджено морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості дріжджів *S.boulardii* і з'ясовано, що вони мають кремово-білий колір, круглу форму, з рівними краями і опуклим центром, з гладкою тускло-блискучою поверхнею, розміром до 10 мкм. Вони накопичуються на щільних і рідких поживних середовищах при рН 5,4-5,5 і температурі 28-30 °С. Дріжджі *S.boulardii* є анаеробами, гетеротрофами.

3. Підібрано тип ферментера серії BIOSTAT для процесу біосинтезу дріжджів. Рамна конструкція виготовлена з нержавіючої сталі, що забезпечує простоту в обслуговуванні. Процес біосинтезу здійснюється у біореакторі з механічним перемішуванням, оскільки дріжджі є анаеробами, не потрібна система подання повітря та піногасіння в апарат. Завдяки високій потужності даний ферментер дав можливість зменшити час ферментації у 2 рази.

4. Встановлено, що доцільно використовувати поживне середовище Рідера з додаванням в якості джерела неорганічного азоту – сечовини концентрацією 0,4%, яке має високі ростові показники. Накопичення біомаси дріжджів *S.boulardii* на цьому середовищі відбувається протягом 8-10 годин на відміну від традиційного – 24 години.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ

1. Dunlap C. A. Osmotic shock tolerance and membrane fluidity of cold-adapted *Cryptococcus flavescens* OH 182.9, previously reported as *C.nodaensis*, a biocontrol agent of *Fusarium head blight* (FEMS) / C.A. Dunlap [et al.] // The Scientific World Journal. – 2007. – Vol. 7. – № 3. – P. 449-458.
2. Шпетна К.О. Використання дріжджів *Saccharomyces boulardii* для виробництва інноваційних лікарських засобів в Україні / К.О. Шпетна, Л.Р. Решетняк // IV Міжн. наук.-практ. конф. присвячена 15-річчю кафедри біотехнології НАУ. – К.: НАУ, 2020.
3. Billoo A. G. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. – [Electronic resource]. – 2006. – V. 12. – № 28. – P. 4557-4560. – Access mode: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4557.pdf>
4. Pilipenko V. I. Probiotics as signaling molecules: *Saccharomyces boulardii* / Pilipenko V.I. // Clinical gastroenterology and gemetology. – 2008. – № 6. – P.456-462.
5. Belousova E. L. *Saccharomyces boulardii* in gastroenterological practice / E. L. Belousova // Gastroenterology. – 2009. – № 2. – P. 5-8.
6. Tkachenko E. I. *Saccharomyces boulardii* (Enterol®) in practice of therapist and gastroenterologists / E. I. Tkachenko, [et al.] // Gastroenterology of St. Petersburg. – 2010. – № 1. – P. 23-24.
7. Цюпа І. *Saccharomyces boulardii* – пробіотик, якому можна довіряти [Електронний ресурс]: Здоров'я України: Медична газета, тематичний номер «Педіатрія» №2 (53). – 2020 р. – режим доступу: www.health-ua.com
8. Szajewska H. *Saccharomyces boulardii* for treating acute gastroenteritis in children: updated meta-analysis of randomized controlled trials / H. Szajewska, A. Skorka // Aliment Pharmacol Ther. – 2009. – P. 960-961.
9. Fuller R. History and development of probiotics // Probiotics. The scientific basis. – London: Chapman and Hall, 1992. – P. 1-9.

10. Хорошилова Н. В. Иммунотерапевтические аспекты применения пробиотиков в клинической практике // Лечащий врач. – 2003. – № 2. – С. 71-73.
11. Модифицирующее действие *Saccharomyces boulardii* на биологические свойства энтеробактерий / Д. А. Кириллов, Н. Б. Перунова, О. Е. Челпаченко и др. // ЖМЭИ. – 2002. – № 4. – С. 57-59.
12. Дубровская М. И. Пробиотики и формирование микробиоценоза у детей первого года жизни / М. И. Дубровская, Ю. Г. Мухина, О. К. Нетребенко // Лечащий врач. – 2003. – №5. – С. 58-60.
13. Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes / A. Lyra, L. Krogius-Kurikka, J. Nikkilä et al. // BMC Gastroenterol. – 2010. – №10. – P.110.
14. Зайков С.В. Иммунотропные свойства пробиотиков / С.В. Зайков // Здоровье Украины. – 2013. – Тематичный номер. – С. 36-39.
15. Широбоков В. П. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом: [навч. посіб.] / В. П. Широбоков, Д. С. Янковський, Г. С. Димент. – К.: ТОВ «Червона Рута – Турс», 2008. – 312 с.
16. Бондаренко В. М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В. М. Бондаренко, Н. М. Грачева // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56-63.
17. Мазанкова Л. Н. Пробиотики: характеристика препаратов и выбор в педиатрической практике / Л. Н. Мазанкова, Е. А. Лыкова // Детские инфекции. – 2004. – № 1. – С. 18-23.
18. Державний реєстр лікарських засобів. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.drlz.kiev.ua>
19. Производство бактериальных концентратов. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://propionix.ru/tehnolohiya-polucheniya-bakterialnyh-koncentratov>
20. Lee Y.K. Handbook of probiotics and prebiotics / Y.K. Lee, S. Salminen // New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. – 2009. – P. 596.
21. Можина Т.Л. Роль и место пробиотических препаратов в современной медицине / Т.Л. Можина // Современная гастроэнтерология. – 2009. – № 1. – С. 5-13.

22. McFarland L.V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients // World Journal of Gastroenterol. – 2010 – P. 2202-2222. – Access mode: <https://www.wjgnet.com>
23. Yagoob P. The Immune and Inflammatory Systems. Blackwell Science NS: Nutrition and Metabolism / P. Yagoob, P.C.Calder // United States of America: Woodhead Publishing. – 2013. – P. 760.
24. Ribeiro B.G. The Prevalence of Metabolic Syndrome and its relationship with dietary antioxidants / B.G. Ribeiro, F. Braun // Durban, South Afrika: 18th International Congress of Nutrition. – 2015. – P. 196.
25. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей / М.: Изд-во АН СССР, 1954. – С.427.
26. Kurtzman C.P., Fell J.W. The Yeasts, a taxonomic study. – 4th edn. – Amsterdam: Elsevier, 1998. – P. 1076.
27. Kurtzman C.P. Methods to identify yeast. Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects / C.P. Kurtzman et al. // Hamburg: Behr's – Verlag, 2003. – P. 69-121.
28. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия / Симферополь: Таврида, 2003. – 560 с.
29. Kreger-van-Rij N.J.W. Taxonomy and systematics of yeasts. The Yeasts. – New York: Acad. Press, 1969. – vol. 1. – P. 5-78.
30. Клив де Блэкберн. Микробиологическая порча пищевых продуктов / Санкт-Петербург: «Профессия». – 2008. – 781 с.
31. Lesage G. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. – June 2006. – P. 317-342
32. Dickinson J.R. Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex Genome Res / J.R. Dickinson et al. // The Scientific World Journal. – 2004. – P. 1043-1051
33. Старовойтова С.О. Технологія пробіотиків / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Т.П.Пирог; Нац.ун-т харч.технологій. – К.: НУХТ, 2012. – 318 с.
34. Łukaszewicz M. 2012. *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* – Probiotic Yeast, Probiotics. – 2012. – P. 385-398

35. Czerucka D. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii* / D. Czerucka et al. // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2007. – P. 767–778
36. Hatoum R. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications / Hatoum R. et al. // *Front Microbiol.* – 2012
37. Martins F.S. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice / F.S. Martins et al. // *Microbes Infect.* – 2013. – P. 270–279.
38. Moré M.I. *Saccharomyces boulardii* CNCM 745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis, a review / M.I. Moré, A. Swidsinski // *Clin. Exp. Gastroenterol.* – 2015. – P. 237–255.
39. Pontier-Bres R. *Saccharomyces boulardii* modifies *Salmonella typhimurium* traffic and host immune responses along the intestinal tract / R. Pontier-Bres, P. Munro. et al. – 2014
40. Нормативно-директивні документи МОЗ України. Нормагут. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua>
41. Слюсаренко Т.П. Лабораторний практикум по мікробіології пищевих производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 208 с.
42. Мельничук М.Д. Загальна біотехнологія: навчальний посібник / М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко та ін. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – С. 252.
43. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – Х.: РІРЕГ, 2011 – Допов. 1. – 2004. – С. 520.
44. Климнюк С. І. Практична мікробіологія К.:Вища школа, 2004 – С.134.
45. Загальна мікробіологія. К.: НУХТ, 2004 – С. 471.
46. Граф-Трио, В. П. Переработка предгидролизатов с высоким содержанием редуцирующих веществ в ферментаторе с интенсивным массообменном / В. П. Граф-Трио // Пути совершенствования, интенсификации и повышения надежности аппаратов в основной химии: тез. Докл. Всесоюзн. Науч. –техн.совещания. – Сумы, 1980. – С. 66-67.
47. Красникова Л.В. Общая и пищевая микробиология: Учеб.пособие.Часть 1 / Л.В. Красникова, П.И. Гунькова – СПб.: Университет ИТМО, 2016. – 135 с.

48. Xin Y. Effect of carbon sources, nitrogen sources and prebiotics on growth of *Saccharomyces boulardii* / Y. Xin, S. Guowei, L Zhangteng, et al. // Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology Vol. XXIII. – China, 2019.

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

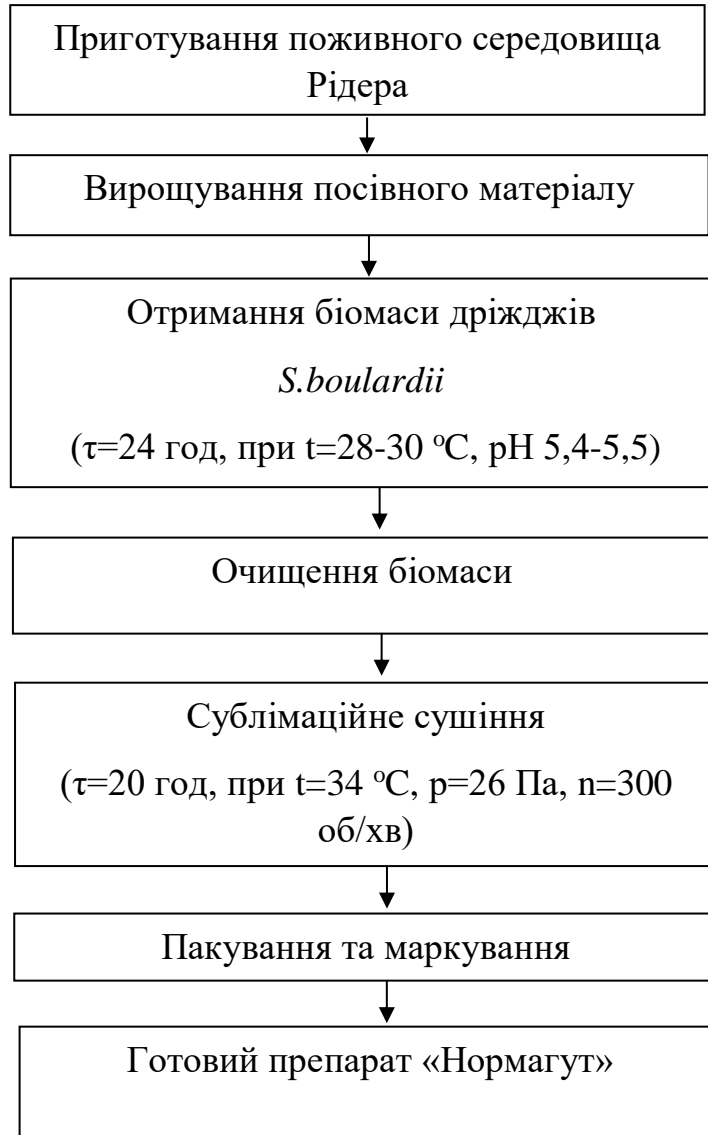
50. Основи охорони праці / [Ткачук К. Н., Халімовський М. О., Запарний В. В. та ін.]; під ред. Ткачука К.Н. та Халімовського М.О. – [2-ге вид., допов. та перероб.] – К.: Основа, 2006. – 448 с.

51. Хільчевський В.К. Відходи виробництва і споживання та їх вплив на природні води: Навчальний посібник // В.М. Савицький, В.К. Хільчевський, О.В.Чунарьов, М.В. Яцюк. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет». – 2007. – 152 с.

52. Ковальчук В.А. Очистка стічних вод: навч. посібник / В.А. Ковальчук. – Рівне: Рівненська друкарня. – 2003. – 622 с.

Додаток А

Традиційна принципово-технологічна схема отримання пробіотика «Нормагут»



Додаток Б

Удосконалена технологічна схема отримання пробіотика «Нормагут»

