

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

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____ М.М. Барановський
«__-__» _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

Тема: Вдосконалення технології виробництва дістичної добавки «Ліпогрейд»

Виконавець: студентка групи ФБ-204м Ковальчук Анна Сергіївна

_____ (підпис)

Керівник: к.т.н., доцент Решетняк Людмила Расулівна

_____ (підпис)

Консультант з розділу «Охорона праці»:

Павлиш В.Д.

_____ (підпис)

Консультант з розділу

«Охорона навколишнього середовища»:

Бовсуновський Є.О.

_____ (підпис)

Нормоконтролер:

Лазарев В.Г.

_____ (підпис)

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ОПП: «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

_____ М.М. Барановський

«___» _____ 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Ковальчук Анни Сергіївни

1. Тема дипломної роботи: «Вдосконалення технології виробництва дієтичної добавки "Ліпогрейд"» затверджена наказом ректора від «16» жовтня 2019 р. № 2390/ст.
2. Термін виконання роботи: з 14 жовтня 2019 р. по 29 грудня 2019 р.
3. Вихідні дані роботи: власні експериментальні дані зроблені на базі Національного авіаційного університету, літературні джерела.
4. Зміст пояснювальної записки: ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ; ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: таблиці, рисунки, діаграми, графіки.

6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи	14.10. – 06.11.2019	
2	Виконання експериментальної частини	07.11. – 27.11.2019	
3	Написання основної частини	28.11. – 14.12.2019	
4	Формулювання висновків та рекомендацій	15.12. – 18.12.2019	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	19.12.2019 – 17.01.2020	
6	Кінцеве оформлення роботи	20.01. – 31.01.2020	
7	Захист дипломної роботи	03.02.2020	

7. Консультація з окремого(мих) розділу(ів):

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	ст. викладач Павлиш В.Д.	15.01.20	21.01.20
Охорона навколишнього середовища	к.т.н., доцент кафедри екології Бовсуновський Є.О.	11.12.19	15.01.20

8. Дата видачі завдання « 14 » жовтня 2019 р.

Керівник дипломної роботи:

_____ (підпис керівника)

Решетняк Л.Р.

_____ (П.І.Б.)

Завдання прийняв до виконання:

_____ (підпис випускника)

Ковальчук А.С.

_____ (П.І.Б.)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Вдосконалення технології виробництва дієтичної добавки "Ліпогрейд"»: 95 сторінок, 25 рисунків, 15 таблиць, 63 використаних джерел.

Мета дипломної роботи — вдосконалити технологію виробництва дієтичної добавки «Ліпогрейд».

Об'єкт дослідження — культивування бактерій дієтичної добавки «Ліпогрейд».

Предмет дослідження — мікроорганізми дієтичної добавки «Ліпогрейд» (*Lactobacillus plantarum*).

Методи дослідження — мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, біохімічні.

Результати магістерської роботи рекомендується використовувати під час проведення наукових досліджень та в практичній діяльності фахівців-біотехнологів.

Недостатньо досліджено джерела вуглецю для живлення молочнокислих бактерій. Тому проводились різні мікробіологічні та біохімічні дослідження зі складовими поживного середовища для культивування лактобактерій та культуральним середовищем. Встановлено вихід біомаси та титровану кислотність культуральних середовищ з різними джерелами вуглецю. Визначено протеолітичну активність.

ПРОБІОТИЧНИЙ ПРЕПАРАТ, КИШКОВА МІКРОФЛОРА, ПРЕБІОТИКИ, МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, БІОМАСА, КИСЛОТНІСТЬ, АКТИВНІСТЬ, ЛАКТОБАЦИЛИ, КУЛЬТИВУВАННЯ.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ , СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	12
1.1. Поняття про пробіотики.....	12
1.1.1. Класифікація пробіотиків.....	12
1.1.2. Терапевтичні функції пробіотиків.....	13
1.1.3. Форми випуску пробіотиків та їх реактивація.....	15
1.2. Аналіз ринку пробіотиків.....	16
1.3. Характеристика дієтичної добавки «Ліпогрейд».....	18
1.3.1. Інструкція для застосування препарату.....	18
1.3.2. Характеристика активних речовин.....	22
1.3.2.1. Полікозанол.....	22
1.3.2.2. Бактерії <i>Lactobacillus plantarum</i>	23
1.3.3. Характеристика допоміжних речовин.....	26
1.4. Висновки до розділу.....	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	34
2.1. Матеріали, необхідні для дослідження.....	34
2.1.1. Цикорій коренеплідний.....	34
2.1.2. Поживні середовища для культивування <i>L. plantarum</i>	38
2.2. Методи досліджень.....	40
2.2.1. Отримання накопичувальної культури.....	40
2.2.2. Отримання чистої культури.....	40
2.2.3. Визначення приналежності виділених бактерій до роду <i>Lactobacillus</i>	43
2.2.4. Мікроскопія лактобактерій.....	43
2.2.5. Відновлення нітратів в нітритах.....	45
2.2.6. Утворення аміаку з аргініну.....	45
2.2.7. Методика визначення каталазної активності.....	47

2.2.8. Методика визначення протеолітичної активності.....	48
2.2.9. Методика визначення активності кислотоутворення.....	49
2.2.10. Методика визначення росту молочнокислих бактерій при різних температурах.....	50
2.2.11. Визначення біомаси ваговим методом.....	50
2.3. Висновки до розділу.....	52
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	53
3.1. Вдосконалена технологія виробництва дієтичної добавки «Ліпогрейд».....	53
3.2. Аналіз отриманих результатів дослідження.....	56
3.2.1. Виділення чистої культури <i>L. plantarum</i>	56
3.2.2. Результати якісних реакцій.....	57
3.2.3. Активність кислотоутворення, оптимальна температура росту та рН в залежності від часу культивування <i>L. plantarum</i>	58
3.2.4. Результати визначення біомаси.....	61
3.3. Висновки до розділу.....	63
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	64
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів.....	64
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів.....	66
4.2.1. Розрахунок безпечного перебування людини у приміщенні з увімкненою лампою ультрафіолетового опромінення.....	69
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів.....	71
4.4. Висновки до розділу.....	73
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	75
5.1. Відходи виробництва пробіотичних препаратів.....	75
5.1.1. Вологість.....	77
5.1.2. Густина.....	77

5.1.3. Вміст енергії.....	77
5.1.4. Хімічний склад.....	78
5.1.5. Перероблення відходів.....	78
5.1.6. Спалювання відходів.....	79
5.1.7. Оцінювання економічних збитків від забруднення навколишнього середовища твердими відходами.....	79
5.2. Розрахунок вартості утилізації відходів виробництва пробіотичних препаратів.....	82
5.3. Висновки до розділу.....	84
ВИСНОВКИ.....	85
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	87
ДОДАТОК А.....	93

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

ЛП — лікарський препарат

ЛФ — лікарська форма

ДД — дієтична добавка

АФІ — активний фармацевтичний інгредієнт

ШКТ — шлунково-кишковий тракт

ХНЩ — холестерин низької щільності

ЛПВЩ — ліпопротеїни високої щільності

ТХО — трихлороцтова кислота

КУО — колонієутворювальні одиниці

ДФУ — Державна фармакопея України

Д — дослід

К — контроль

АНД — аналітична нормативна документація

MRS — поживне середовище з глюкозою, яке використовують для культивування молочнокислих бактерій

MRS + ц — поживне середовище з цикорієм

КС — капустиане середовище з глюкозою

КС + ц — капустиане середовище з цикорієм замість глюкози

ВСТУП

В останні роки в Україні широкого розповсюдження набуло введення населенням в щоденний раціон біологічно активних добавок. Наукові дослідження в області харчування людини переконливо довели, що фізіологічно повноцінне харчування необхідне для зростання, розвитку, збереження здоров'я, підтримання високої працездатності, статевої і розумової активності. Важливими компонентами в харчуванні людини є амінокислоти, мікро- та макроелементи, харчові волокна, органічні кислоти [2].

Однак з продуктами харчування до організму людини потрапляють не всі необхідні для його нормального функціонування нутрієнти, що в свою чергу негативно позначається на здоров'ї. Саме тому пріоритетним напрямом досліджень є створення функціональних інгредієнтів, збагачених необхідними для організму людини компонентами [3]

Актуальність теми. Останнім часом в Україні дуже гостро постає проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології [1]. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів, зокрема біфідобактерій та лактобацил, порушуються процеси травлення та перебіг багатьох основних біохімічних процесів в організмі, внаслідок чого погіршується загальний стан організму та знижується його стійкість до дії патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [4].

Головними причинами цього є неконтрольоване використання антибіотиків та неякісних біологічних добавок, недостатнє і нераціональне харчування, шкідливі звички, психо-емоційне перевантаження, швидкий ритм життя [2].

Основним засобом профілактики і лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, викликаних дисбактеріозом, є препарати, що належать до групи пробіотиків, використання яких дозволяє покращити, а інколи й відновити стан мікрофлори кишечника та слизових оболонок організму людини, що приводить до загального покращання стану здоров'я та попереджає розвиток цілої низки хронічних захворювань [4].

Одним з важливих факторів, що визначає виробничу можливість створення пробіотичних препаратів, є вибір поживного середовища з урахуванням фізіологічних потреб відібраних штамів бактерій, їх біосинтетичної активності, вартості компонентів середовища та стабільності готового препарату [1]. Лактобактерії є ауксотрофними організмами і тому надзвичайно вибагливі до штучних поживних середовищ [2].

Сьогодні найбільш оптимальним для культивування лактобактерій є середовище MRS. Але на стадії основного технологічного процесу отримання пробіотика — виробничого культивування — використання складного і вартісного поживного середовища є економічно недоцільним, особливо у випадку отримання харчових домішок і продуктів функціонального призначення. Тому виникає нагальна потреба у здешевленні існуючих технологій вирощування пробіотичних мікроорганізмів за рахунок введення в практику виробництва нових фізіологічно ефективних і дешевих поживних середовищ [3].

Метою дипломної роботи є вдосконалити технологію виробництва дієтичної добавки «Ліпогрейд».

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

1. Дати визначення поняттю «пробіотики», проаналізувати ринок пробіотиків в Україні, охарактеризувати дієтичну добавку «Ліпогрейд»;
2. Описати матеріали та методики таких експериментів, як отримання накопичувальної і чистої культури *L. plantarum*, мікроскопія її, тести на відновлення нітратів в нітрити, утворення аміаку з аргініну, каталазну та протеолітичну активності, активність кислотоутворення, визначення росту молочнокислих бактерій при різних температурах та визначення біомаси;
3. Довести, що використання цикорію в якості джерела вуглецю замість глюкози можливе при виробництві дієтичної добавки «Ліпогрейд»;
4. Проаналізувати небезпечні і шкідливі виробничі фактори та їх профілактику у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів, а також профілактичні заходи на випадок пожежі та (або) вибуху;

5. Визначити, які відходи утворюються при виробництві пробіотичних препаратів та як їх знешкодити.

Методи дослідження — мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, статистичні.

Наукова новизна роботи. Недостатньо досліджено джерела вуглецю для живлення молочнокислих бактерій. Тому проводились різні мікробіологічні та біохімічні дослідження зі складовими поживного середовища для культивування лактобактерій та культуральним середовищем. Встановлено вихід біомаси та титровану кислотність культуральних середовищ з різними джерелами вуглецю. Визначено протеолітичну активність.

Практична значимість. Використання поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій з дешевими джерелами вуглецю значно зекономить витрати підприємства на сировину і збільшить обсяги виробництва.

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 Л.Р. Решетняк на базі Національного авіаційного університету.

Апробація отриманих результатів. Матеріали дипломної роботи можуть використовуватись на лекціях дисципліни “Фармацевтична біотехнологія” кафедри біотехнології ФЕБІТ НАУ.

Публікації. За матеріалами дипломної роботи було опубліковано статтю.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Поняття про пробіотики

Термін «пробіотик» широко використовують вже понад 50 років. Його визначення уточнювалося в ході накопичення експериментальних даних. У 2003 році канадський професор мікробіології та імунології Г. Рейд запропонував таке визначення: пробіотики — це живі мікроорганізми, застосування яких в адекватних дозах сприяє поліпшенню здоров'ю людини. Але дотепер не з'ясовано походження цього терміну, а також час його першого згадування [5].

Нині широко використовують визначення терміна «пробіотики», запропоноване російським вченим Б.А. Шендеровим: пробіотики — це живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які за природного способу введення зумовлюють позитивні ефекти на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму людини чи тварини внаслідок оптимізації та стабілізації його мікробіоти. Поняття «пробіотик» визначають як антонім до антибіотиків [6].

1.1.1. Класифікація пробіотиків

За сучасною класифікацією препарати для корекції мікробіоценозу поділяють на шість груп:

- монокультури живих мікроорганізмів, які містять представників нормальної мікрофлори кишечника (монокомпонентні препарати);
- комплекс живих мікроорганізмів (дво- та чотириштамові пробіотики, полікомпонентні препарати, симбіотики);
- субстанції, оральне введення яких стимулює ріст і розмноження індигенної (нормальної) флори, насамперед лакто- та біфідобактерій (пребіотики);

- монокультури чи комплекс мікроорганізмів і субстанції, що стимулюють їхнє приживлення, ріст та розмноження (синбіотики);
- генно-інженерні штами мікроорганізмів із заданими властивостями, їхні структурні компоненти та метаболіти (рекомбінантні пробіотики);
- інші сполуки мікробного, рослинного або тваринного походження, крім мікроорганізмів або стимуляторів їхнього росту та розмноження, які позитивно впливають на функції клітин органів і тканин людини (полікомпонентні комбіновані препарати) [5].

Пробіотики, що містять один штам мікроорганізмів, називають **монопробіотиками**, кілька штамів (від двох до тридцяти) — **асоційованими пробіотиками** [6].

Пробіотики можна призначати широкому колу живих організмів (людині, тваринам, птахам, риbam) незалежно від видової належності хазяїна, від якого були виділені штами пробіотичних бактерій (**гетеропробіотики**). Частіше пробіотики призначають представникам того виду хазяїна, з біоматеріалу якого виділено відповідні штами (**гомопробіотики**). В останні роки у практику впроваджуються **аутопробіотики**, до складу яких входять штами нормальної мікрофлори, ізольовані від конкретної особи та призначені для корекції її мікроекології [6].

1.1.2. Терапевтичні функції пробіотиків

Комплексні пробіотики конструюють з урахуванням того, що кожна особа, застосовуючи полікомпонентний пробіотичний препарат, створює сприятливі умови для відбору з нього представників тих видів лакто- та біфідобактерій, які в її кишечнику перебувають у дефіциті. Антагоністичні властивості пробіотичних мікроорганізмів у свіжоприготовленій рідкій формі більш виражені, ніж у тих самих, проте ліофілізованих штамів. Це може зумовлюватися наявністю у рідких формах пробіотиків вищих концентрацій оцтової та молочної кислот, пероксиду водню, а можливо й інших антагоністичних та регуляторних субстанцій-метаболітів [5].

Систематичне застосування пробіотичних препаратів, біологічно активних добавок і функціональних продуктів харчування підвищує колонізаційну резистентність, посилює імунітет, запобігає розвитку алергічних ускладнень, нормалізує пул гістаміну та щавлевої кислоти, виявляє гіпохолестеринемічні, протипухлинні та інші позитивні дії на хазяїна [5].

На жаль, позитивний ефект пробіотиків навіть за тривалого вживання нерідко має транзиторний характер, а іноді його й зовсім немає. Більше того, не зважаючи на безпечність пробіотиків, добавок і функціональних продуктів харчування, з'явилися окремі повідомлення про виникнення в осіб, які тривалий час застосовували живі пробіотичні мікроорганізми, різних ускладнень (лакцидемії у немовлят, аутоімунні захворювання, алергічні прояви, опортуністичні інфекції, дисбіотичні стани, зумовленні вживанням великих доз пробіотичних препаратів) [5].

Однією з основних причин неефективності пробіотиків вважається чужорідність для людини мікроорганізмів, що входять до їхнього складу, недостатнє врахування високої видової, індивідуальної та анатомічної специфічності автохтонної (постійної) мікрофлори осіб, яким призначають ці засоби корекції мікроекологічних порушень. Внаслідок цього штами мікроорганізмів, що проявляють *in vitro* або *in vivo* пробіотичну активність, не завжди активні в організмі людини [7].

Для підвищення ефективності пробіотикотерапії запропоновано новий підхід до селекції пробіотичних штамів та їх лікувально-профілактичного значення. Перед призначенням пробіотиків пропонується дослідити *in vitro* характер взаємозв'язків (біосумісність) пробіотичних штамів з індигенними лактобактеріями майбутнього реципієнта. Розроблено простий спосіб визначення біосумісності резидентних і пробіотичних лактобактерій *in vitro*, що дає змогу з мінімальними часовими та економічними витратами підібрати пробіотичні засоби і продукти харчування для індивідуальної бактеріотерапії та бактеріопротекції [5].

1.1.3. Форми випуску пробіотиків та їх реактивація

Бактеріальні пробіотики — це категорія ЛЗ, в яких основним діючим компонентом є не хімічні речовини, а життєздатні мікроорганізми. Для реалізації лікувальної дії таких препаратів необхідний перехід пробіотичних штамів у метаболічно активний стан в ентеральних середовищах пацієнта, зазвичай не оптимальних для розвитку пробіотичних штамів. У готовій ЛФ пробіотика бактеріальні клітини перебувають у стані зниженої метаболічної активності (рідкі пробіотики) або в анабіозі (сухі пробіотики). Для переходу в метаболічно активний стан бактеріальні штами мають пройти процес реактивації, що передбачає кілька стадій [5].

Реактивація пробіотиків тривалого зберігання, що містять суху ліофілізовану біомасу (ампульна та капсульна форми, порошок, свічки, таблетки) є складнішою. Вона охоплює стадії регідратації, репарації зворотних пошкоджень клітин, що виникли на різних етапах технологічного процесу (сушіння, подрібнення, змішування з допоміжними речовинами, пресування), та лаг-період розвитку бактеріальної популяції. Реактивація пробіотиків нетривалого зберігання (на основі рідкої культури) обмежується лише лаг-періодом [6].

Регідратація (повернення води в клітину) здійснюється досить швидко, чому сприяє пориста структура ліофілізованої біомаси. Тривалість репарації залежить від умов технологічного процесу одержання сухого пробіотику. У процесі репарації структурна та функціональна цілісність клітин відновлюється [6].

Лаг-період характеризується адаптацією культури до внутрішнього середовища пацієнта. Під час цього процесу кількість клітин не змінюється, але маса і розмір збільшуються. Тривалість цього періоду залежить від фізіологічного стану і титру пробіотичного штаму в одній дозі препарату, від складу і фізико-хімічних показників ентеральних середовищ пацієнта та може змінюватися від кількох годин до кількох діб [5].

У фазі активного росту лікувальна дія пробіотика проявляється найповніше.

Нині пробіотики випускають у таких формах:

- ліофільно висушена біомаса у флаконах або ампулах;
- ліофільно висушена біомаса у желатинових капсулах;
- супозиторії ректальні та вагінальні з ліофільно висушеної біомаси;
- ліофільно висушена біомаса, пресована в таблетки, вкриті розчинною у кишечнику оболонкою;
- лінгвальні таблетки, що розсмоктуються під язиком [5].

Нетрадиційною, але ефективною в деяких клінічних випадках, ЛФ є кисломолочний продукт, який утворюється під час заквашування молока пробіотичним штамом [5].

Більшість пробіотиків випускають у ліофілізованій формі (порошки, таблетки, капсули, супозиторії). Вона характеризується високим терміном зберігання, зручністю транспортування та зберігання, не потребує суворого дотримання температурного режиму. Але такі пробіотики характеризуються тривалим виходом мікробних клітин зі стану анабіозу (2-4 год за оптимальних умов культивування) [5].

В умовах ШКТ за цей проміжок часу більша частина пробіотичних клітин може елімінуватися, не встигнувши активізуватися. В організмі людини значна частина ліофілізованої мікрофлори (близько 70%) гине в агресивних умовах ШКТ ще до реактивації [6].

Значно ефективнішими є живі пробіотики у вигляді рідкої суспензії у спеціальному захисному середовищі. У таких препаратах бактерії перебувають у фізіологічно активній формі та можуть діяти відразу після прийому препарату. Вони не потребують тривалої реактивації [5].

1.2. Аналіз ринку пробіотиків

На фармацевтичному ринку України пробіотики містять переважно біфідо-, коли- та лактобактерії, дріжджі. За даними рис. 1.1 можна зробити висновок про перевагу та перспективність симбіотичних засобів в сегменті ринку пробіотиків. До того ж, лише 10 % з представлених препаратів містять пребіотичну складову, та відносяться до класу синбіотиків.

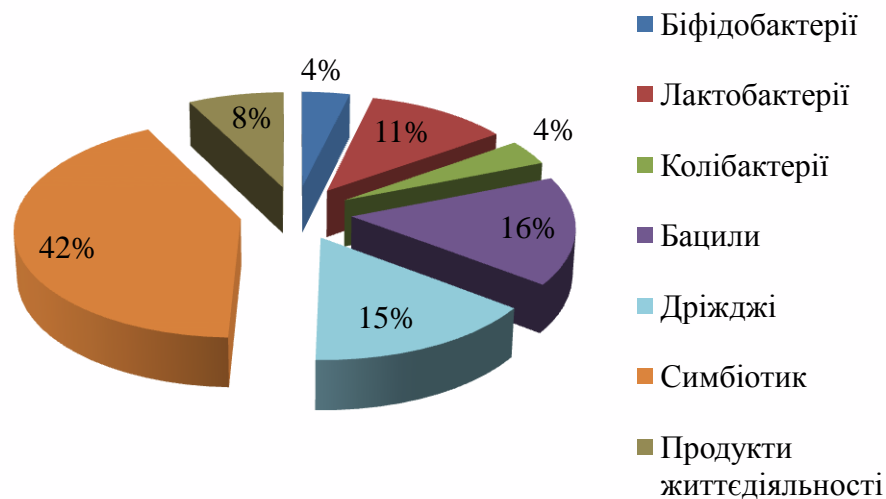


Рис.1.1. Бактеріальна основа пробіотичних препаратів закордонних виробників

На сьогодні широкому колу споживачів також доступні пробіотичні продукти харчування, харчові добавки, та їх кількість, зареєстрованих в Україні, постійно зростає. Разом з тим, на українському ринку лікарських препаратів переважають імпорتنі пробіотики (рис 1.2.).

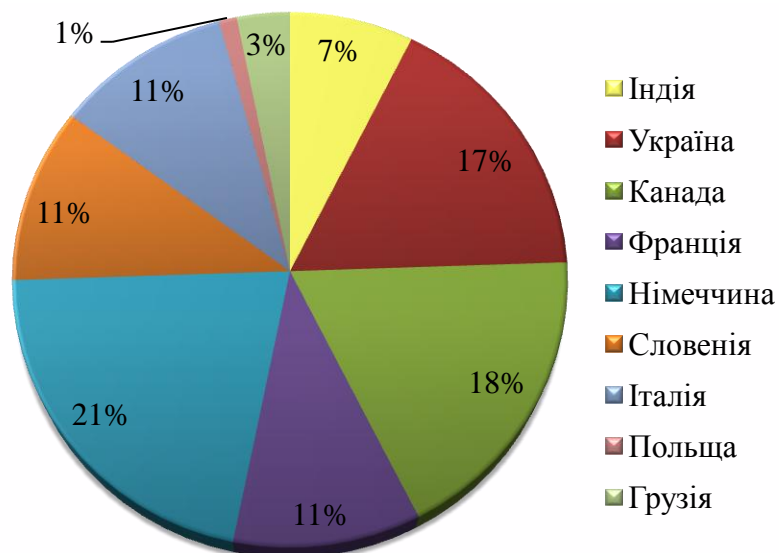


Рис. 1.2. Виробники пробіотичних лікарських препаратів, представлених на фармацевтичному ринку України

Як видно з рис. 1.2, вітчизняному виробнику належить лише 17 % ринку, який представлений ліофілізованими монопрепаратами. Препарати закордонного

виробництва становлять понад 80 %, з яких більшість належить до класу симбіотиків (44 %). Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення [7]

Лікарські препарати даної фармакотерапевтичної групи представлені на ринку України у вигляді таких лікарських форм: порошки, краплі, таблетки й капсули. Переважна форма випуску препаратів вітчизняного виробництва – дозований ліофілізований порошок у флаконах. При порівнянні лікарських форм препаратів пробіотиків вітчизняного та закордонного виробництва, останні віддають перевагу випуску пробіотика чи синбіотика у вигляді капсул (56 %) (рис. 1.3).

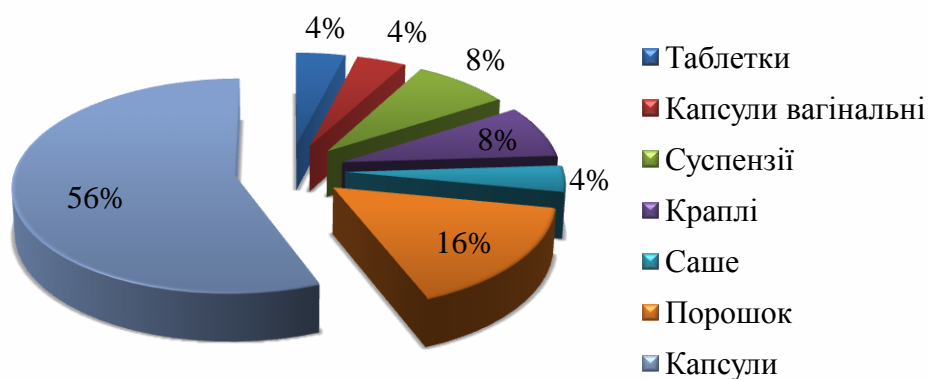


Рис. 1.3. Форми випуску пробіотичних препаратів закордонними виробниками

1.3. Характеристика дієтичної добавки «Ліпогрейд»

1.3.1. Інструкція для застосування препарату

Ліпогрейд

Добавка дієтична

ТУ У 10.8-39071152-005:2016

Склад:

На 1 капсулу: жива активна культура *Lactobacillus plantarum* — не менше $2 \cdot 10^9$ КУО, полікозанол — 10,0 мг;

допоміжні речовини: целюлоза мікрокристалічна, кросповідон, кремнію діоксид, натрію цитрат, магнію стеарат, цукор кристалічний (сахароза) [8].

Ліпогрейд завдяки вмісту полікозанолу та активної культури *Lactobacillus plantarum* сприяє зменшенню ризику виникнення атеросклеротичних змін судин та серцево-судинних захворювань [8].

Полікозанол — природна суміш вищих первинних аліфатичних спиртів, отриманих шляхом екстрагування з цукрового очерету (*Saccharum officinarum*); полікозанол сприяє зменшенню концентрації загального холестерину та ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), збільшенню вмісту ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ). Гіполіпідемічний ефект досягається за рахунок пригнічення синтезу холестерину та ЛПНЩ. Також має антиоксидантні властивості; антитромботичний ефект (зниження ризику тромбоутворення за рахунок запобігання надлишковій агрегації тромбоцитів), не впливаючи при цьому на показники коагуляції крові; вазопротекторний ефект за рахунок підвищення рівня «захисного» холестерину ліпопротеїдів високої щільності [8].

Ефект Ліпогрейду також визначають лактобактерії, які в процесі своєї життєдіяльності впливають на ліпідний обмін та рівень холестерину завдяки комплексу механізмів. Це безпосереднє засвоєння (асиміляція) холестерину бактеріями, зв'язування холестерину клітинними мембранами бактерій, стимуляція

розпаду жовчних кислот під впливом ферментної активності бактерій, що призводить до зменшення синтезу холестерину [8].

Також лактобактерії володіють антагоністичною активністю по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, створюють сприятливі умови для оптимальної композиції мікробіоти кишківника. Лактобактерії також беруть участь в синтезі вітамінів і розщепленні білків, з утворенням амінокислот, а також стимулюють роботу імунної системи [7].

Рекомендації щодо вживання:

Ліпогрейд застосовується в якості дієтичної добавки до раціону харчування як джерело активної культури *Lactobacillus plantarum* та полікозанолу дітям від 12 років та дорослим:

- з метою нормалізації рівня загального холестерину, зниження рівня ЛПНЩ в сироватці крові і поліпшення функціонального стану серцево-судинної системи, а також зменшення ризику серцево-судинних захворювань;

- з метою поліпшення процесів ліпідного та вуглеводного обміну, зокрема у людей з підвищеною масою тіла;

- для відновлення балансу лактобактерій в кишківнику при порушенні композиції кишкової мікробіоти, зокрема у людей з підвищеною масою тіла;

- при функціональних порушеннях ШКТ (здуття, метеоризм, нудота, діарея), що виникли на тлі дефіциту лактобактерій [8].

Спосіб вживання та рекомендована добова доза:

Вживати внутрішньо під час вечері (оскільки біосинтез холестерину посилюється в нічний час), запиваючи питною водою [8].

Добові дози для дорослих та дітей залежно від віку:
дітям від 12 років та дорослим — по 1–2 капсули 1 раз на добу [8].

Доза може бути змінена за рекомендацією лікаря.

Тривалість вживання:

- для зниження рівня загального холестерину — 3–4 тижні;

- для попередження розвитку порушень мікробіоти кишківника — 3–4 тижні;

— для корекції порушень мікробіоти кишківника — 4–6 тижнів.

При необхідності курс прийому Ліпогрейду можна повторити [8].

Застереження:

Не вживати при індивідуальній чутливості до компонентів добавки дієтичної. Вплив на вагітність не досліджувався. Не рекомендується вживати під час вагітності та грудного вигодовування [8].

У період застосування необхідно дотримуватися низькокалорійного раціону харчування з обмеженням вживання жирів тваринного походження і контролювати рівень холестерину в сироватці крові через кожні 2 місяці [8].

Може підсилювати антиагрегантну дію ацетилсаліцилової кислоти.

Не перевищувати зазначену рекомендовану дозу для щоденного споживання.

Не слід використовувати як заміну повноцінного раціону харчування.

Курс застосування визначає лікар індивідуально. Перед прийомом добавки слід проконсультуватися з лікарем.

Не є лікарським засобом [8].

Термін придатності:

2 роки.

Умови зберігання:

Зберігати в оригінальній упаковці виробника у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С.

Допускається кінцевому споживачу зберігання в оригінальній упаковці протягом 1 місяця при температурі не вище 25 °С.

Зберігати у недоступному для дітей місці [8].

Форма випуску:

Капсули кишковорозчинні №30. По 10 капсул у блістері. По 3 блістери в упаковці [8].

Назва та повна адреса виробника:

ТОВ «ФЗ «БІОФАРМА», Україна, 09100, Київська обл., м. Біла Церква, вул. Київська, 37. Тел. (044) 277–36–10 [8].

Класифікація:

Об Дієтичні добавки до продуктів харчування, що впливають на функції ССС

6.2. Дієтичні добавки, що сприяють нормалізації ліпідного обміну [8].

1.3.2. Характеристика активних речовин

1.3.2.1. Полікозанол

Полікозанол — загальний термін, яким позначається природна суміш жирних спиртів, котра є натуральним екстрактом рослинного воску. Використовують як харчові добавки для зниження ХНЩ і підвищення ЛПВЩ, а також для запобігання атеросклерозу. Застосовується як компонент лікарських засобів. Хімічна формула $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$, де $n=24-34$ (рис. 1.4) [9].

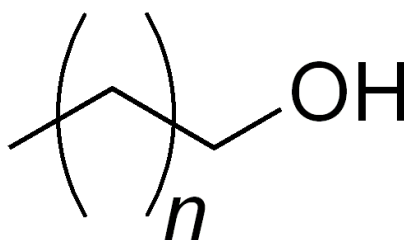


Рис. 1.4. Спрощена структурна формула полікозанолу

Фізичні властивості. Полікозанол являє собою суміш декількох жирних спиртів, отриманих з бджолиного воску, а також з воску таких рослин, як цукрова тростина та ямс. У полікозанолі найбільше спирту октакозанолу (олія зародків пшениці). За ним за відсотковим вмістом йде триаконтанол. У набагато більш низькій концентрації в полікозанолі міститься ряд інших жирних спиртів: бегеніловий спирт, лігноцеріловий спирт ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$), церіловий спирт ($\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{OH}$), 1-гептакозанол, 1-нонакозанол, 1-дотріакозанол та тетратріакоктанол [9].

Механізм дії:

– Гіполіпідемічний ефект досягається за рахунок пригнічення синтезу холестерину в момент між утворенням ацетату і мевалонату та стимуляції розпаду холестерину ЛПНЩ у гепатоцитах шляхом активації ліпаз.

– Вазопротекторний ефект забезпечується за рахунок підвищення рівня «захисного» холестерину ЛПВЩ, перешкоджання окисленню холестерину ЛПНЩ.

– Антитромботичний ефект досягається за рахунок запобігання агрегації тромбоцитів шляхом впливу на синтез простагландину (знижує рівень у сироватці тромбоксану A₂ та підвищує рівень простацикліну) та зниження ризику тромбоутворення, не впливаючи на показники коагуляції [10].

1.3.2.2. Бактерії *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum — широко поширений вид грампозитивних анаеробних неспороутворюючих молочнокислих бактерій. Він росте при температурі від 15 до 45 °С та рН від 3,4 до 8,8. Оптимальною для росту температурою є 30 °С. При 45 °С ріст дуже малий або відсутній взагалі. *L. plantarum* має один з найбільших геномів в роді *Lactobacillus* і є дуже гнучким і універсальним видом. Зустрічається в нормі в слині, в товстій кишці та інших органах людини. Здатність цих бактерій продукувати антимікробні речовини допомагає їм виживати в шлунково-кишковому тракті людини. Антимікробні речовини, що виробляються *L. plantarum* показали значний вплив на грампозитивні і грамнегативні бактерії. **Таксономія** *L. plantarum* за науковою класифікацією наведена в табл. 1.3.2.2.1 [11].

Таблиця 1.1

Наукова класифікація бактерій *L. plantarum*

Домен	<i>Bacteria</i>
Філа	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Bacilli</i>
Порядок	<i>Lactobacillales</i>
Родина	<i>Lactobacillaceae</i>
Рід	<i>Lactobacillus</i>
Вид	<i>L. plantarum</i>

Рід *Lactobacillus* — це облигатні анаероби, які значно поширені у мікробних екосистемах людини. Вони виявляються у всіх біотопах травного тракту, починаючи з ротової порожнини і закінчуючи прямою кишкою, є домінуючою мікрофлорою біотопу піхви. У шлунку лактобактерії містяться у концентрації $10^2 - 10^3$ КУО/см³ шлункового соку, в тонкій кишці — до $10^3 - 10^4$ КУО/см³ кишкового соку, у товстій (залежно від віку макроорганізму) — від $10^6 - 10^7$ до 10^{10} КУО/см³ фекалій, у піхві — $10^6 - 10^9$ КУО/см³. Лактобактерії сприяють всмоктуванню кальцію (трансформуючи кальцій, що потрапив з їжею, у легкозасвоюваний лактат кальцію) [11].

Морфологія. Клітини *L. plantarum* — це палички із закругленими кінцями, прямі, зазвичай 0,9–1,2 мкм і завдовжки 3–8 мкм, зустрічаються поодинокі, парами або короткими ланцюгами (рис. 1.5 В) [12].

Культуральні властивості. На щільних поживних середовищах *L. plantarum* формують колонії сферичні, гладенькі з рівними краями, непрозорі, не пігментовані, білого кольору (рис. 1.5 А). Колонії мають діаметр 2-5 мм [12].

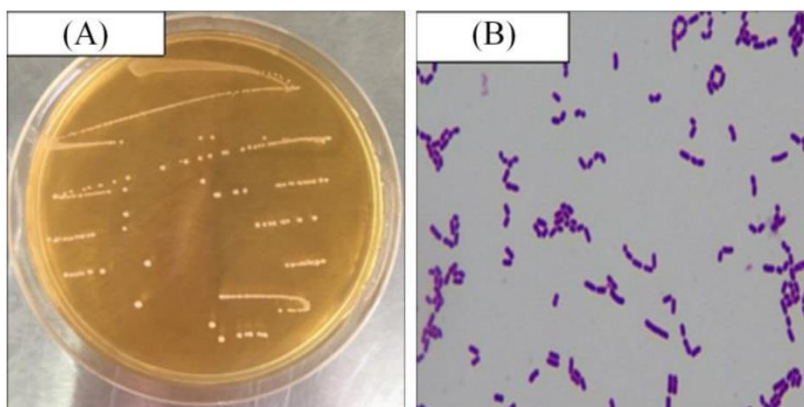


Рис. 1.5. Культура *L. plantarum*: А — колонії; В — клітини під світловим мікроскопом, забарвлення за Грамом

Біохімічні властивості. *L. plantarum* є факультативно гетероферментативним видом. Утворює з 1 моля глюкози 1 моль молочної кислоти, 1 моль етилового спирту та 1 моль вуглекислого газу, використовуючи окиснювальний пентозофосфатний шлях розщеплення глюкози. Енергетичний вихід складає 1 молекулу АТФ на 1 моль використаної глюкози [12].

Фізіологічні функції. Захисна функція лактобактерій полягає у:

- механічному захисті слизової оболонки за рахунок комплементарності гліколіпідів їхньої клітинної стінки до глікопротеїнів мембран нетероцитів;
- пригніченні патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів;
- конкуренції за поживні речовини;
- утворенні органічних кислоті багатоатомних спиртів, бактеріоцинів, пероксиду водню;
- зниженні рН у просвіті кишки [11].

Імуномодулююча дія лактобактерій виявляється у підвищенні фагоцитарної активності макрофагів і нейтрофілів, стимуляції утворення секреторного IgA, підвищенні вмісту цитокінів, продукції α -, β -, γ -інтерферонів [11].

У регуляції процесів обміну лактобактерії відіграють таку роль:

- зброджування вуглеводів з утворенням коротколанцюгових жирних кислот;
- синтез ферментів глікозидаз, які розщеплюють вуглеводи, що не всмоктуються у тонкій кишці;
- синтез протеаз, які руйнують ферменти травлення;
- синтез ліпаз, що завершують гідроліз жирів;
- продукції вітамінів групи А, В, С, К;
- детоксикації екзогенних та ендогенних субстратів за рахунок біотрансформації та абсорбції [12].

Важливим механізмом пригнічення патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів є здатність лактобактерій продукувати низькомолекулярні метаболіти — монокарбонові органічні кислоти (молочну і оцтову), також багатоатомні спирти і гази (водень, вуглекислий газ, метан, аміак, NO) [12].

L. plantarum зменшують ризик утворення каменів у нирках завдяки оксалатмодифікуючій активності [11].

Механізм протипухлинної активності лактобацил пов'язаний з антимікробними, ферментативними, біосинтетичними та імуностимулювальними властивостями. Асоційовані зі слизовою оболонкою кишечника ці бактерії характеризуються універсальними імуномодулюючими властивостями, зокрема

імуностимуляцією та імуносупресією. Стимульовальні ефекти проявляються в механізмах активації ретикулоендотеліальної системи ШКТ і продукції низки цитокінів, які забезпечують баланс між гуморальним та клітинно-опосередкованим типом імунної відповіді, мітогенних й імуногенних властивостей [12].

1.3.3. Характеристика допоміжних речовин

Відповідно до Фармакопеї США 23 **кросповідон** — це нерозчинний у воді синтетичний зшитий гомополімер N-вініл-2-піролідінон, від білого до світло-кремового кольору, тонко подрібнений, сипкий, практично без смаку та запаху гігроскопічний порошок. Точне визначення молекулярної маси не встановлено через нерозчинність (більше 1 000 000). Хімічна формула $(C_6H_9NO)_n$ (рис. 1.6) [13].

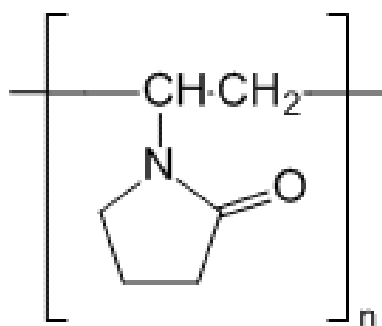


Рис. 1.6. Структурна формула кросповідону

Кросповідон має такі властивості: рН 5,0–8,0 (1% масо-об’ємна водна суспензія); щільність — 1,22 г/см³; питома поверхня та розмір часток (таблиця); максимальна сорбційна вологість становить $\approx 60\%$; практично нерозчинний у водних та найпоширеніших органічних розчинниках [14].

Кросповідон є нерозчинним у воді таблетковим дезінтегрантом і розпушувачем, який використовують у концентрації 2–5%, при виготовленні таблеток прямим пресуванням або методами вологої та сухої грануляції. Він швидко виявляє високу капілярну активність і має здатність до гідратації з невеликою тенденцією формувати гелі. Дослідження показують, що величина часток кросповідону дуже впливає на розпадання таблеток з анальгезивними речовинами.

Частки більшого розміру забезпечують швидше розпадання таблеток; може використовуватися для поліпшення розчинності поганорозчинних речовин. Діюча речовина адсорбується на частках кросповідону за наявності підходящого розчинника з наступним випаровуванням останнього. Ця методика приводить до збільшення швидкості розчинення. Кросповідон вивчався також як супердезінтеграційна речовина. Здатність сполуки до набрякання була досліджена при безпосередньому використанні електронної мікроскопії. Також досліджено вплив кросповідону на розчинення поганорозчинних речовин у таблетках. Кросповідон сумісний з більшістю органічних та неорганічних фармацевтичних інгредієнтів. При наявності великої кількості води кросповідон може утворювати молекулярні аддукти з деякими матеріалами подібно до повідону [13].

Кросповідон є гігроскопічною речовиною і потребує зберігання в герметично закритій тарі в прохолодному сухому місці [14].

Натрію цитрат — АФІ синтетичного походження. Білий кристалічний порошок або гранульовані кристали, злегка розпливаються у вологому повітрі, легкокорозивний у воді, практично нерозчинний у 96% спирті. Зберігають у щільно закритому контейнері без доступу повітря. Хімічна формула $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (рис. 1.7). Молекулярна маса 294,1 [15].

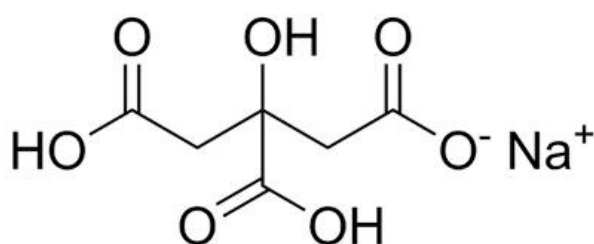


Рис. 1.7. Структурна формула цитрату натрію

Ідентифікують реакцією на цитрати, реакціями на натрій. Кількісно визначають методом неводної ацидиметрії (індикатор — розчин нафтолбензеїну).

Фармакологічна група. V07A C; B05C B02 — гемоконсерванти; сольові розчини [16].

Фармакологічні ефекти. Знижує згортваність крові, підвищує лужні резерви крові та облужнює сечу. Зв'язує кальцій (IV плазмовий фактор згортваності крові) і

робить неможливою гемокоагуляцію (*in vitro*). Збільшує вміст натрію в організмі. Зміна реакції сечі з кислої на лужну призводить до зникнення дизуричних явищ.

Застосування. Консервація крові. Симптоматичне лікування циститу [16].

Магнію стеарат згідно з Фармакопеею США 23 — сполука магнію та твердих органічних кислот і складається, головним чином, з магнію стеарату і магнію пальмітату ($C_{32}H_{62}MgO_4$). Європейська Фармакопея 2005 характеризує його як суміш магнієвих солей різних жирних кислот, головним чином стеаринової та пальмітинової, а також незначних кількостей інших жирних кислот. Хімічна формула $C_{36}H_{70}MgO_4$, $[CH_3(CH_2)_{16}COO]_2Mg$ (рис. 1.8). Молекулярна маса 591,34 [18].

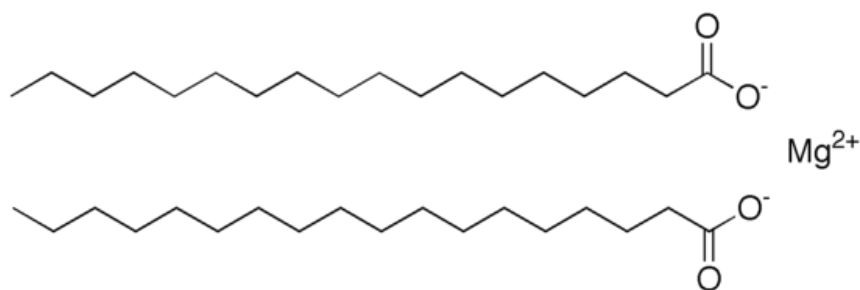


Рис. 1.8. Структурна формула стеарату магнію

Отримують магній стеарат у формі ангідриду, дигідрату та тригідрату реакцією водних розчинів магній хлориду з натрій стеаратом або реакцією магнію оксиду (магнію гідроксиду або магнію карбонату) із стеариновою кислотою при підвищеній температурі. Гідратна форма магній стеарату характеризується стабільністю, на відміну від безводної форми, яка при вологості повітря понад 50% абсорбує значну кількість вологи і поступово переходить у тригідрат. Отримання безводного магній стеарату проводять висушуванням гідрату при 105 °С. Зовні магній стеарат являє собою дрібний порошок світло-білого кольору з характерним смаком та слабким запахом стеаринової кислоти; насипна густина до усадки — 0,159 г/см³; насипна густина після усадки — 0,286 г/см³; щільність справжня — 1,092 г/см³; температура самозаймання — 250 °С; температура плавлення — 126–130 °С (високоочищена форма); питома поверхня — 1,6–14,8 м²/г; практично нерозчинний в етанолі (95%), етері та воді; помітно розчиняється в підігрітих

бензені та етанолі (95%). Несумісний з солями феруму, сильними окисниками та розчинами сильних кислот і лугів [17].

Магнію стеарат широко використовується у складі фармацевтичних препаратів, косметичних та харчових виробів. Входить до складу таблеток і капсул як ковзна речовина в концентрації 0,25–5,0%. Оскільки магній стеарат є гідрофобною речовиною, він уповільнює швидкість розчинення твердих лікарських форм, що зумовлює його використання у мінімальних концентраціях. Швидкість розчинення та механічна міцність компонентів таблеток і розчинність вмісту капсульної оболонки залежать також від часу перемішування компонентів. Високий вміст магній стеарату і тривале змішування сприяють отриманню гідрофобних часток порошку, які мають незначну здатність до диспергування, і тому цей параметр потребує суворого контролю [19].

Магнію стеарат є відносно нетоксичною та не подразливою речовиною, проте при застосуванні у великій кількості може чинити проносну дію та подразнювати слизові оболонки.

Зберігається в щільно закритих контейнерах, у сухому прохолодному місці [18].

Цукроза — олігосахарид, який складається з фруктози та глюкози. Хімічна формула $C_{12}H_{22}O_{11}$ (рис. 1.9). Молекулярна маса 342,30 [18].

У фармацевтичній промисловості використовують 3 види цукру: сферичний, пресований та кондитерський. Згідно з Фармакопеєю США 23 цукор сферичний — це приблизно сферичні гранули, що містять від 62,5 до 91,5% цукрози, інше — крохмаль. Розчинність залежить від співвідношення цукроза/крохмаль (цукроза добре розчиняється у воді, крохмаль — практично не розчиняється у холодній воді). Цукор пресований містить від 95 до 98% цукрози, інше — крохмаль (мальтодекстрин) або інвертний цукор. Цукор кондитерський (син.: цукрова глазур, цукрова пудра) — порошок найдрібнішого помелу, що містить до 95% цукрози [20].

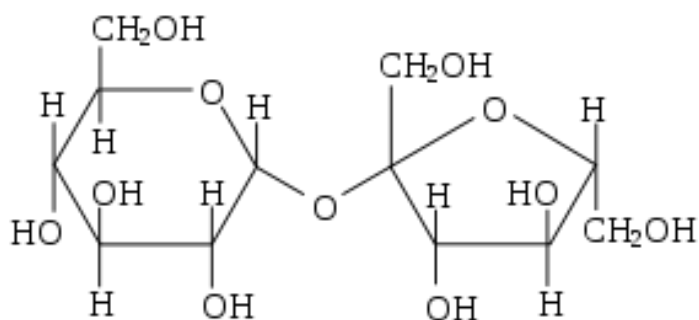


Рис. 1.9. Структурна формула цукрози

При виробництві ЛП застосовують цукор очищений та вибілений хлорним вапном (цукор-рафінад) у вигляді найдрібнішого порошку, який використовують як наповнювач (при виготовленні таблеток, капсул, драже), коригент смаку (при виготовленні ліків для хворих на цукровий діабет використовують інвертований цукор), у медицині — антидот (при отруєнні ціаністим калієм). Цукор пресований використовують при виробництві жувальних таблеток методом прямого пресування. Цукор є корисним компонентом у виробництві сиропів (у педіатрії). Різновидом цукру є молочний цукор (лактоза). При високих концентраціях (70%) Цукор кондитерський використовують як консервант. При внутрішньому вживанні концентрований цукровий сироп може зневоднювати організм. Зберігають цукор у щільно закритій тарі, у сухому та прохолодному місці [20].

Аморфний діоксид кремнію безводний (аеросил), належить до групи синтетичних активних високодисперсних мінеральних наповнювачів. У фармації використовується як допоміжна речовина, стабілізатор, гелеутворювач, адсорбент, поліпшує плинність таблетованих, мазевих, гелевих та інших сумішей. Інколи використовується як АФІ (має бактерицидні властивості). Отримують шляхом гідролізу парів кремнію тетрахлориду в полум'ї водню при температурі $>1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1100–1400 $^{\circ}\text{C}$) [20].

Аеросил відносять до теоретично «чистих» речовин, які вивільняють активні інгредієнти без витрати енергії. Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що кожна основна частинка аеросилу складається з 4 окремих шарів (рисунок). Ядро цієї частинки є тримірним полімером з елементів SiO_2 . Маючи на поверхні частинок силанові $\text{Si}-\text{OH}$ і силосанові $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ групи, аеросил здатний за рахунок водневих

зв'язків створювати чарункоподібний каркас, що дозволяє обмежувати температурне розширення загущеної рідини. Силоксанові й силанові групи в аеросилі є функціональними, а зв'язок кремній — кисень характеризується високою міцністю (досягає 372,5 Дж/моль), що пояснюється його полярністю, завдяки якій ковалентний зв'язок наближається до іонного [21].

У виробництві таблеток аеросил використовується у концентрації 0,1–0,5% як ковзна та розпушуюча (0,1–2,0%) речовина, що скорочує час їх розпадання, полегшує процес грануляції, поліпшує плинність таблетованої маси. Адсорбційні властивості аеросилу використовують у виробництві порошків, екстрактів та інших фармацевтичних препаратів [21].

Численними фармакологічними, токсикологічними та біофармацевтичними дослідженнями підтверджено, що аеросил при внутрішньому застосуванні індиферентний, добре переноситься хворими, має лікувальні властивості при захворюваннях ШКТ та інших запальних процесах, може бути джерелом постачання кремнію в організм. Є відомості про те, що аеросил може сприяти скороченню гладких м'язів і судин, а також має бактерицидні властивості [21].

Аеросилвмісні фармацевтичні системи не виявляють подразливої та токсичної дії. Такі ж властивості притаманні мазям при використанні есилону і аеросилу як основи (композиція есилону-5, загущена 15% аеросилу при виготовленні мазей з антибіотиками і кортикостероїдами). Мазі з А. легко видавлюються з туб, добре фіксуються на шкірі, мають пролонговану дію [20].

Целюлоза мікрокристалічна — очищена, частково деполімеризована целюлоза являє собою білий, без смаку і запаху кристалічний порошок, що складається з пористих частинок. Комерційна целюлоза мікрокристалічна відрізняється за розміром частинок і вмістом вологи, що зумовлює її властивості й застосування. Хімічна формула $(C_6H_{10}O_5)_n$, де $n \approx 220$ (рис. 1.10). Молекулярна маса $\approx 36\ 000$ [20].

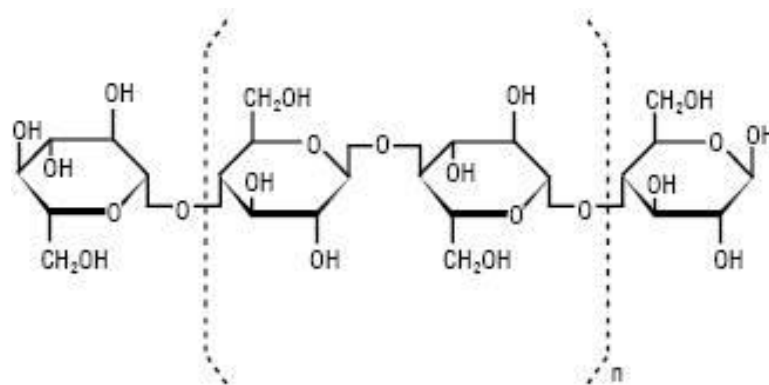


Рис. 1.10. Структурна формула целюлози мікрокристалічної

Целюлозу мікрокристалічну отримують шляхом контрольованого кислотного гідролізу високоочищеної α -целюлози, отриманої з рослинних волокнистих матеріалів, що призводить до часткової деполімеризації полімерних ланцюгів. При подальшому гідролізі, очищенні фільтрацією й висушуванні розпиленням отримують пористі частинки необхідного розміру [22].

Целюлозу мікрокристалічну широко застосовують у фармацевтичній промисловості, головним чином як розпушувач (5–15%) або зв'язуючу речовину/розріджувач (20–90%) у таблетках і капсулах (20–90%) при вологій грануляції та прямому пресуванні. Целюлоза мікрокристалічна є ковзною (змащуючою), адгезивною речовиною (5–20%), адсорбентом (20–90%) та наповнювачем. Також її використовують у косметологічній та харчовій промисловості [24].

Комерційна целюлоза мікрокристалічна за своїми властивостями близька до натуральної целюлози, яка зустрічається у вигляді природного компонента в харчових продуктах. Вона нетоксична й зовсім нешкідлива, однак споживання великої кількості клітковини може виявляти проносний ефект. Целюлоза мікрокристалічна є несумісною з сильними окиснювальними агентами.

Целюлоза мікрокристалічна є стабільним, але гігроскопічним матеріалом, тому повинна зберігатися в герметично закритій тарі в прохолодному, сухому місці [23].

1.4. Висновки до розділу

Пробіотики — це живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які за природного способу введення зумовлюють позитивні ефекти на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму людини чи тварини внаслідок оптимізації та стабілізації його мікробіоти. Пробіотики випускають в рідкій і сухій формах. Ліофілізовані форми мають пройти процес реактивації [5].

Вітчизняному виробнику пробіотиків належить 17 % ринку, який представлений ліофілізованими монопрепаратами. Препарати закордонного виробництва становлять понад 80 %, з яких більшість належить до класу симбіотиків.

ДД «Ліпогрейд» відноситься до ДД, що сприяють нормалізації ліпідного обміну. Діючими її речовинами є жива активна культура *L. plantarum* (не менше $2 \cdot 10^9$ КУО) та полікозанол. Ліпогрейд застосовують з метою нормалізації рівня загального холестерину, зниження рівня ЛПНЩ в сироватці крові і поліпшення функціонального стану серцево-судинної системи, а також зменшення ризику серцево-судинних захворювань, поліпшення процесів ліпідного та вуглеводного обміну, зокрема у людей з підвищеною масою тіла, для відновлення балансу лактобактерій в кишківнику при порушенні композиції кишкової мікробіоти, при функціональних порушеннях ШКТ (здуття, метеоризм, нудота, діарея), що виникли на тлі дефіциту лактобактерій [8].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали, необхідні для дослідження

2.1.1. Цикорій коренеплідний

Цикорій коренеплідний (*Cichorium intybus L. var. sativum Lam*) — цінна харчова, технічна та лікарська рослина (рис. 2.1). Коренеплоди і листя рослин цикорію містять корисні речовини: білок, цукор, каротин, вітаміни групи В, аскорбінову кислоту, глікозид інтібін, що має специфічний гіркуватий смак, дубильні речовини, мінеральні солі, органічні кислоти, холін, а також цінний полісахарид — інулін, який при розщепленні дає фруктозу. У квітах знайдено кумаринові глікозиди, в молочному соусі – гіркі речовини (лактucin, лактуконікрін) та ін. [25-27].



Рис. 2.1. Цикорій дикий (*Cichorium intybus L.*)

Цінний хімічний склад цикорію дозволяє використовувати цю рослину для отримання цілого ряду продуктів дієтичного харчування, харчових добавок, лікарських препаратів і високопоживних кормів (рис. 2.2) [28].

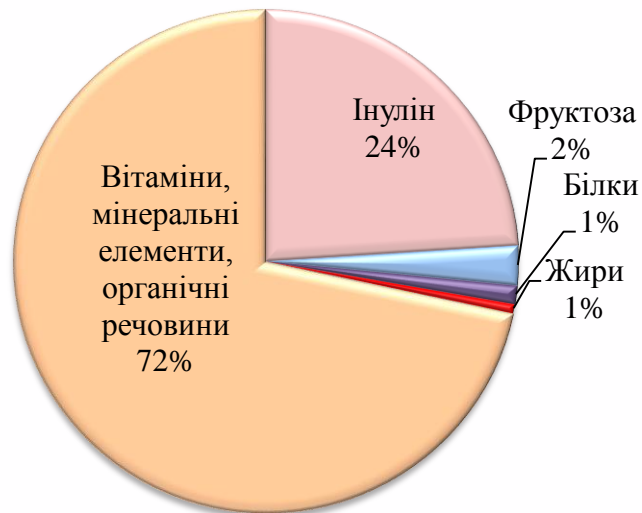


Рис. 2.2. Хімічний склад цикорію

Найціннішою речовиною цикорію є полісахарид інулін, застосування якого в медицині практично необмежене. Він використовується у фармакології для виготовлення понад 40 лікарських препаратів, що застосовуються при лікуванні хвороб шлунку, печінки, нирок, серця, нервової системи [29].

У коренеплодах цикорію коренеплідного міститься 16–24 % інуліну, який сприяє виведенню з організму радіонуклідів та токсинів, 2,5 % фруктового цукру, 1,2 % білків, 0,6 % жирів, вітаміни А, В1, В2, В12, РР та більше 30 мінеральних елементів [30].

Однією з основних умов, від якої залежить успіх селекції цикорію коренеплідного є наявність різноманітного вихідного матеріалу, що має комплекс важливих господарсько-цінних ознак та ступінь їх вивченості. У процесі створення вихідного матеріалу, окрім урожаю коренеплодів враховується вміст сухих речовин і інуліну, насиченість яких залежить від походження генотипу. Для підтримки і поліпшення господарсько-цінних ознак даної культури необхідно проводити постійні індивідуальні відбори на основі трансгресивної селекції, з урахуванням, при визначенні напрямку продуктивності, первинної оцінки матеріалів за вмістом інуліну, а потім визначенню і маси коренеплоду [30-33].

Вивчення вмісту сухих речовин у коренеплодах цикорію у окремих селекційних номерів показало досить високу їх варіабельність, що вказує на високий генетичний потенціал і можливість селекції за цією ознакою. Так, вміст сухих

речовин в середньому за роки досліджень між окремими номерами змінювався – від 28,6 % до 31,6 % до маси сирі речовини (рис. 2.3) [31].

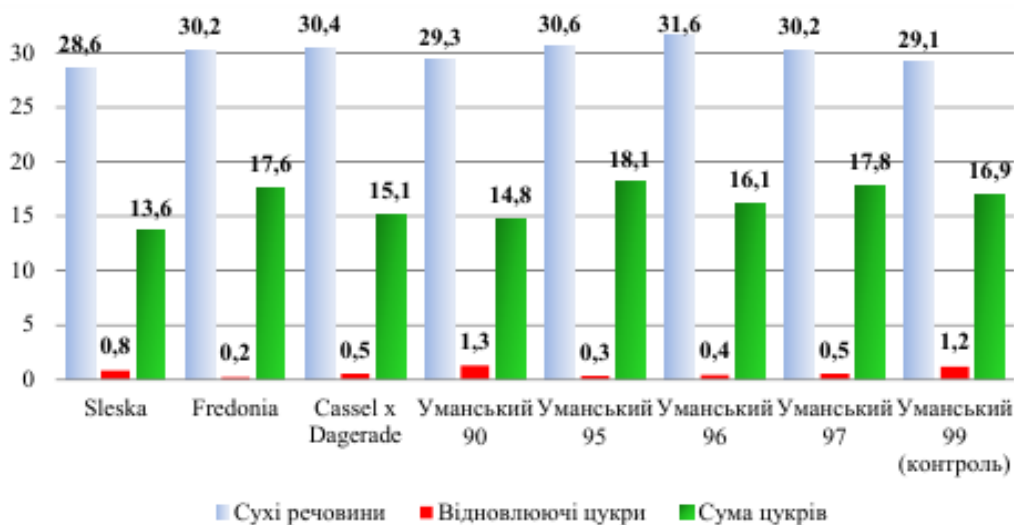


Рис. 2.3. Хімічний склад селекційних номерів цикорію коренеплідного за вмістом сухої речовини та цукрів, % до маси коренеплоду

Найвищий вміст сухих речовин у коренеплодах забезпечив сорт Уманський 96, різниця якого порівняно з контролем (Уманський 99) становила 2,5 %. Близькими до контролю за цим показником були номери сортів *Sleska* і сорт Уманський 90. Інші селекційні номери мали проміжні показники за вмістом сухої речовини із незначною різницею між собою [31].

У залежності від форми коренеплоду відхилення між номерами з низьким і високим вмістом сухої речовини було зафіксовано на рівні з подовженою формою – 0,7 %, конусоподібною – 1,1 %, циліндричною – 1,5 % до маси сирі речовини [31].

Вуглеводи складають основну частину сухих речовин коренеплоду цикорію. З вуглеводів найбільше значення мають моноцукри – глюкоза, фруктоза, галактоза і арабіноза [31].

Визначення вмісту відновлюючих цукрів, які входять до складу сухих речовин коренеплодів цикорію, показало, що їх кількість варіює від 0,2 до 1,3 % до маси сирі речовини. Так, в залежності від форми коренеплоду, між потомствами селекційних номерів спостерігалось відхилення: з подовженою формою від 0,8 до 1,3%; з конусоподібною – 0,2–1,2 %; з циліндричною – 0,4–0,5 % до маси сирі речовини [31].

Вивчення індивідуальної мінливості за вмістом суми цукрів у коренеплодах цикорію вказує на різний їх вміст. У середньому в коренеплодах вміст суми цукрів варіює від 13,6 % до 18,1 % до маси сирої речовини. Основна маса коренеплодів, в роки досліджень мала 15 %, 16 % і 17 % до маси сирої речовини суми цукрів [31].

У розрізі сортів найвищий вміст суми цукрів спостерігався в сортах Уманський 95 (18,1 %), Уманський 97 (17,8 %) і *Fredonia* (17,6 %), що відповідно на 1,2 %, 0,9 % та 0,7 % більше, ніж у контрольного варіанту Уманський 99 [31].

Полісахарид інулін є основною речовиною, завдяки якому культивується цикорій. Накопичення інуліну в коренеплодах відбувається протягом усього періоду вегетації і досягає свого оптимального вмісту в кінці вересня на початку жовтня місяців, на період технічної стиглості сортів, з масовим всиханням нижніх листків [31].

Вивчення групової мінливості за вмістом інуліну в коренеплодах показало досить істотні відмінності між потомством, де варіювання коливалося від 11,5 % до 15,7 % до маси сирої речовини (рис. 2.4) [31].

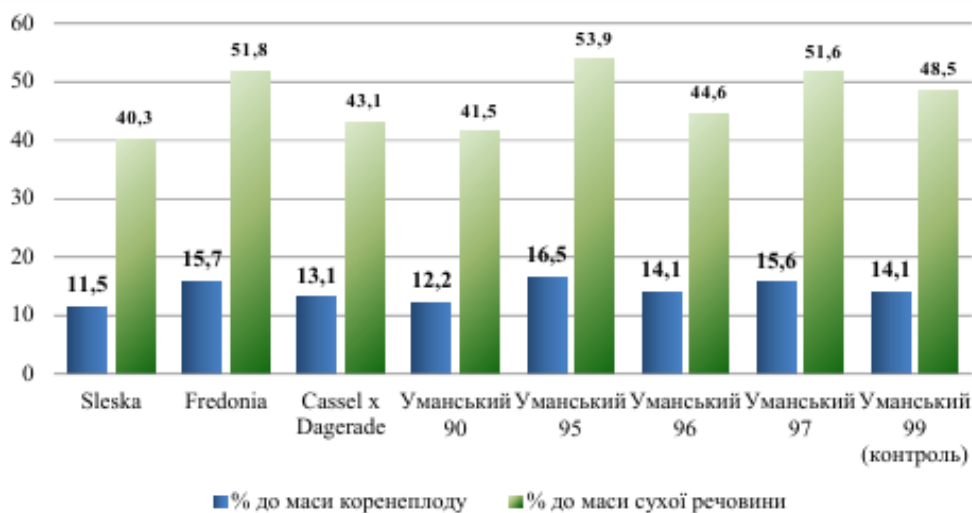


Рис. 2.4. Вміст інуліну у селекційних номерах цикорію коренеплідного, %

Досліджувані селекційні номери з циліндричною формою мали проміжні показники вмісту інуліну і в середньому за роки досліджень становили від 13,1 до 14,1 % до маси сирої речовини [31].

У залежності від сорту високий вміст інуліну встановлено в номерах сортів Уманський 95, *Fredonia* і Уманський 97, що становив 53,9; 51,8 і 51,6% відповідно до маси сухої речовини.

Результати досліджень (рис. 2.3, 2.4) підтверджують закономірність, що з підвищенням вмісту сухої речовини в коренеплодах цикорію коренеплідного водночас зростає і вміст інуліну [31].

У проведенні експерименту цикорій використовувався в поживних середовищах для культивування лактобацил в якості джерела вуглецю замість глюкози. Він брався в такій же кількості, як і глюкоза.

2.1.2. Поживні середовища для культивування *L. Plantarum*

До складу поживних середовищ для культивування та контролю біологічних показників молочнокислих бактерій входять такі речовини: пептон сухий (ГОСТ 13805-76), натрію хлорид (ГОСТ 4233-77), лактози моногідрат (ГОСТ 4963-85), L-цистеїн (ДФУ вид. 1, ст. 483), агар мікробіологічний (ГОСТ 17206-84), або агар харчовий (ГОСТ 16280-70), марганець сірчаноокислий (ГОСТ 435-77), магній сірчаноокислий (ГОСТ 4523-77), калій фосфорноокислий двозаміщений (ГОСТ 2493-75), глюкоза (ГОСТ 975-88), ТВІН-80 (Євр.Фарм., 7.0, том 2, 2010), амонію цитрат (ГОСТ 734-79), натрію ацетат (ГОСТ 199-78), дріжджі хлібопекарські пресовані (ДСТУ 4812:2007), казеїн технічний (ДСТУ 4639:2006), печінка великої рогатої худоби заморожена (ГОСТ 19342-73), вода очищена (ДФУ вид.1, доп. 1, с. 308 – 309), залози підшлункові великої рогатої худоби і свиней заморожені (ГОСТ 11285-93), сахароза (ГОСТ 5833-75), желатин харчовий (ГОСТ 11293-89), молоко знежирене (ГОСТ 10970-87), хлороформ (ГОСТ 20015-88).

Для культивування культури *L. plantarum* використовувались капустяне поживне середовище та середовище MRS.

Середовище MRS (Ман, Рогоза, Шарп) є специфічним для лактобактерій. Його склад наведено в табл. 2.1. При 25 °С водні розчини мають рН $6,5 \pm 0,2$. Пептон та печінковий екстракт є джерелами необхідних поживних речовин, глюкоза –

ферментативним субстратом та джерелом енергії. Дріжджовий екстракт забезпечує вітамінами групи В. Твін-80 є джерелом жирних кислот, необхідних для росту лактобактерій. Ацетат натрію і цитрат амонію пригнічують ріст стрептококів, цвілевих грибів та багато інших мікроорганізмів.

Таблиця 2.1

Склад поживного середовища MRS

Компоненти	Кількість, г/л
Марганець сульфат	0,05
Магній сульфат	0,1
L-цистеїн	0,2
Амоній цитрат	2,0
Натрій ацетат	5,0
Калій гідрофосфат	2,0
Глюкоза кристалічна	20,0
Пептон основний сухий	10,0
Твін-80	1,0
Дріжджовий екстракт	5,0
Печінковий екстракт	10,0
Агар-агар	12,0

Середовище MRS має вигляд гомогенного сипучого жовтого порошку. Приготоване середовище має бурштиновий колір, прозоре чи злегка опалесцентне. Якщо додати до рідкого середовища агар, то в пробірках, чашках Петрі воно формує гель.

Спосіб приготування: розмішати 65,15 г середовища в 1000 мл дистильованої води. Прокип'ятити для повного розчинення частинок. Стерилізувати автоклавуванням при 1,1 атм (121 °С) протягом 15 хв. Охолодити до 45-50 °С. Добре перемішати і розлити в стерильні чашки Петрі, пробірки чи флакони.

Середовище слід зберігати за температури нижче +30 °С. Використовувати до дати, вказаної на етикетці. Готове середовище зберігати за температури +2...8 °С.

Капустяне середовище є найдешевшим середовищем для культивування молочнокислих бактерій, але воно недостатньо забезпечує їх живильні потреби.

Спосіб приготування: 200 г подрібненої білокачанної капусти заливають 1 л води та кип'ятять 10 хв. Віджимають через подвійний шар марлі. Отриману рідину

фільтрують через складчастий фільтр, розводять в два рази. До відвару додають 2 % глюкози і 1 % пептону. Розливають у пробірки та стерилізують при 0,05 МПа 15 хв. Для отримання щільного середовища додають 2 % агару.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Отримання накопичувальної культури

Накопичувальна культура — культура, в якій переважають представники однієї фізіологічної групи мікроорганізмів.

Спосіб отримання накопичувальної культури — це використання елективних поживних середовищ, тобто поживних середовищ, які сприяють росту мікроорганізмів визначеної групи (в даному випадку — молочнокислих бактерій), а для інших є несприятливими. Це середовища зі слабо кислим рН (MRS, Рогоза) або вміщуючі етанол (№ 3 и № 6) [25].

Посів на рідкі елективні середовища можна проводити безпосередньо зі зразка, який містить лактобацили, або із змиву з нього. Друге частіше використовують при виділенні лактобацил з рослинного матеріалу. Наприклад, при виділенні лактобацил із силосу наважку силосу (5 г) поміщають в колбу з 50 мл стерильної водопровідної води і 3 г піску. Колбу поміщають на качалку (180 об./мин) на 10 хв. З отриманої витяжки роблять висів на елективне середовище [25].

2.2.2. Отримання чистої культури

Чиста культура — культура, яка містить мікроорганізми одного виду.

Чисту культуру отримують за допомогою щільних поживних середовищ. На них потрібно отримати окремі колонії культур, які вважають 40 результатом розвитку однієї клітини. Шляхом пересіву окремих колоній вдається виділити чисті культури [25].

Способи отримання окремих колоній на щільному поживному середовищі:

Послідовні розведення (в стерильній водопровідній воді чи фізіологічному розчині) з таким розрахунком, щоб при посіві на поживне середовище вирости ізольовані колонії [26].

Для приготування розведень стерильну водопровідну воду розлити по 9 мл в стерильні пробірки. Стерильною піпеткою/дозатором перенести в першу пробірку 1 мл досліджуваної суспензії мікроорганізмів — це буде перше розведення (1:10). Поміняти наконечник дозатора і ретельно перемішати ним отримане перше розведення (кілька разів вбирати в нього і випускати суспензію клітин). Цим же наконечником перенести 1 мл з першого розведення у другу пробірку — це буде друге розведення (1:102). Повторити ці дії необхідну кількість разів [26].

Висів на щільні середовища з пробірок з розведеннями можна проводити двома способами:

– метод поверхневого посіву. Розплавлене та охолоджене до 45-50 °С щільне поживне середовище розлити в стерильні чашки Петрі в такій кількості, щоб дно чашки було повністю покрите (15-20 мл). Чашку залишити на горизонтальній поверхні до тих пір, поки не застигне середовище. Для посіву привідкрити кришку чашки Петрі і на поверхню щільного середовища нанести піпеткою/дозатором 100 мкл рідкої культури. Швидко розподілити краплю по поверхні середовища за допомогою скляного стерильного шпателя Дригальського [26].

– метод глибинного посіву. У випадку лактобацил (оскільки вони є факультативними анаеробами і мікроаерофілами) цей спосіб бажаний.

В стерильну чашку Петрі внести піпеткою/дозатором 1 мл рідкої культури, після чого налити 15-20 мл розплавленого та охолодженого до 45 °С щільного поживного середовища, акуратно перемішати та залишити чашку на горизонтальній поверхні до тих пір, поки не застигне середовище [26].

Посів виснажливим штрихом. Культуру відбирають петлею і на поверхню щільного середовища проводять штрихи (рис. 2.5 а). Отримати окремі колонії можна кількома способами:

- розділити чашку на чотири сектори та провести штрихи в кожному з секторів, як показано на рис. 2.5 б.
- провести посів штрихом по всій поверхні чашки так, щоб штрих був більш частим з початку посіву і більш рідким в кінці (рис. 2.5 в) [26].

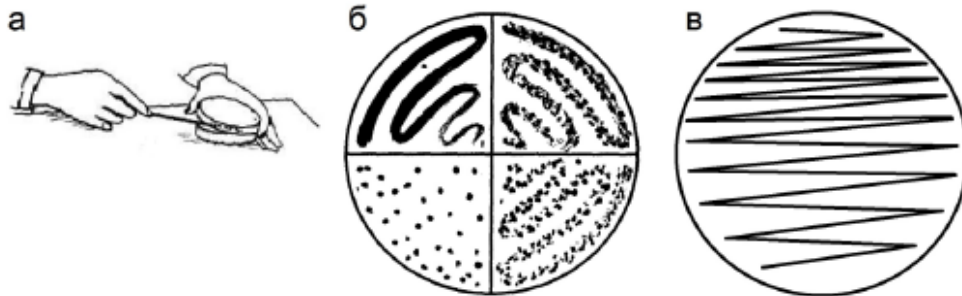


Рисунок 2.5. Схема посіву культури мікроорганізмів на поверхню щільного середовища петлею при посіві виснажливим штрихом

- провести штрихи в порядку, вказаному на рис. 2.6. Перед кожним новим штрихом петлю стерилізують в полум'ї пальника [26].

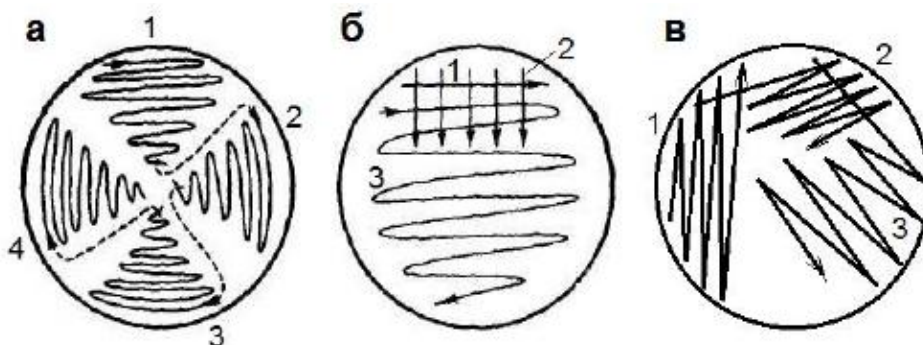


Рисунок 2.6. Схема послідовності посіву культури мікроорганізмів на поверхню щільного середовища петлею при посіві виснажливим штрихом

Після посіву чашки Петрі поміщають в термостат кришками вниз, щоб конденсаційна вода, що утворилася на кришці при застиганні агару, не завадила отримати ізольовані колонії [25].

У мікроаерофільних та анаеробних лактобацил може бути відсутній ріст при посіві виснажливим штрихом. В цих випадках необхідно використовувати методи культивування анаеробних і мікроаерофільних мікроорганізмів; послідовність дій для отримання чистої культури буде наступною [26]:

- окремі колонії, що мають зони просвітлення на середовищі з крейдою, пересіяти на рідке середовище MRS чи Рогоза та інкубувати при 30-40 °С протягом 48 год.
- приготувати послідовні розведення та висіяти глибинно на середовище MRS або Рогоза. Інкубувати при 30-40 °С протягом 48 год [26].

2.2.3. Визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacillus*

Визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacillus* проводять по ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы обнаружения молочнокислых микроорганизмов»: по відношенню до фарбування за Грамом, рухомості, наявності спороутворення та каталази [27].

До лактобацил, згідно ГОСТ 10444.11-89, відносяться бактерії:

- грампозитивні;
- неспороутворюючі;
- паличкоподібні (від коротких до довгих);
- каталазно-негативні.

Окремо відмічають форму, розмір і колір колоній на щільному поживному середовищі [27].

2.2.4. Мікроскопія лактобактерій

Підготовка предметних і покривних скельць для приготування препаратів. Предметні та покривні скельця вважаються чистими, коли крапля води розтікається по їхній поверхні [27].

Нові скельця зазвичай кип'ятять в 1%-ому розчині соди, потім промивають дистильованою водою, слабким розчином соляної кислоти і потім знову дистильованою водою [27].

Скельця, що вже використовувались, кип'ятять в мильній воді і потім не менше доби витримують в розчині хромової суміші. Від біхромату скельця відмивають дистильованою водою [27].

Можна швидко знежирити скельця, натерши їх в сухому вигляді господарським милом та витерши потім чистою хлопчатопаперовою тканиною.

Хромова суміш. 6 г двохромовокислого калію розчиняють в 100 мл води, потім в розчин обережно додають 100 мл сірчаної кислоти [27].

Після багаторазового використання темно-помаранчевий колір хромової суміші змінюється на темно-зелений. Така суміш вже не володіє миючими властивостями [27].

Хромова суміш руйнує рослинні і тваринні тканини. При потраплянні на одяг чи шкіру, негайно промити великою кількістю води, потім розведеним розчином аміаку чи соди, а потім знову водою [27].

Фарбування за Грамом. За Грамом рекомендується фарбувати клітини молодих, краще добових культур. На одному предметному склі рекомендується приготувати препарати трьох культур: в центрі — досліджуваний, справа і зліва — відомих грампозитивних (наприклад, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*) і грамнегативних (наприклад, *Escherichia coli*) [27].

– Приготувати фіксований препарат: на знежирене предметне скло нанести краплю досліджуваної культури, розподілити на площі 4см² та висушити на повітрі. Провести фіксацію в полум'ї пальника [27].

– Пофарбувати протягом 2 хв карболовим генціановим або кристалічним фіолетовим. Барвник змити, не промиваючи [27].

– Нанести на мазок розчин Люголю на 2 хв, після чого розчин Люголю злити.

– Нанести на мазок 96%-й етиловий спирт на 30-45 с. Швидко промити водою.

– Пофарбувати мазок водним розчином фуксину протягом 2 хв. Барвник злити, препарат промити водою і висушити [27].

– Мікроскопувати з імерсійною системою.

Грампозитивні бактерії мають синьо-фіолетовий, грамнегативні — рожево-червоний колір [27].

2.2.5. Відновлення нітратів в нітритах

Дослідами Рогози було встановлено, що у молочнокислих бактерій можна спостерігати здатність відновлювати нітрати в нітритах в середовищах з низьким вмістом вуглеводу і досить високим рН. Автор рекомендує використовувати модифіковане середовище ББЛ (табл. 2.2) з рН 7,2 [28].

Таблиця 2.2

Склад модифікованого поживного середовища ББЛ

Компоненти	Вміст, %
Пептон	2,0
Глюкоза	0,1
Дріжджовий екстракт	0,3
Na ₂ HPO ₄	0,2
KNO ₃	0,1

Середовище засівається однією краплею культури, вирощеної на бульйоні МРС, та інкубується при 37 ° або 30 °С (в залежності від виду бактерій) протягом 6-7 діб. Після інкубації крапля культуральної рідини поміщається на скло і до неї додається по краплі реактивів 1 і 2. Рожевий чи червоний колір свідчить про наявність редуктази. В якості К використовується незасіяне середовище [28].

Реактиви:

Реактив 1 містить 2 г сульфанилової кислоти в 250 мл 5 н оцтової кислоти;

Реактив 2 містить 1,5 мл диметил- α -нафтиламіну (або α -нафтиламіну) в 250 мл 5 н оцтової кислоти.

Можна використовувати й інші середовища, але при цьому дотримуватись вимог у відношенні рН та низької концентрації глюкози [28].

Молочнокислі палички не відновлюють нітрати в нітритах [28].

2.2.6. Утворення аміаку з аргініну

Цей тест успішно застосовується для диференціації видів роду *Streptococcus*, але він має значення і для визначення видів роду *Lactobacillus* [28].

Для встановлення здатності молочнокислих бактерій утворювати аміак з аргініну часто використовується доволі просте середовище Нівена (табл. 2.3) з рН 7,0. Це ж середовище без аргініну слугує К [28].

Таблиця 2.3

Склад поживного середовища Нівена

Компоненти	Вміст, %
Триптон	0,05
Глюкоза	0,1
Дріжджовий екстракт	0,5
K ₂ HPO ₄	0,2
D-аргінін моногідрохлорид	0,3

5-7 мл середовища засівається 1 краплею культури та інкубується 3-14 діб. Потім до 1-3 краплям культуральної рідини додають 1 краплю розчину Несслера та негайну відмічають появу помаранчевого кольору (позитивна реакція). Кедді до вказаного вище середовища додає 0,05% твіна 80 і 0,1% агару (рН середовища 6,0). Д враховують через 3, 5, 8 діб інкубації при 30 °С і через 2 і 5 діб, якщо культивування йде при 37 °С [28].

Можна використовувати томатний бульйон Брігс з 0,3% L-аргініну солянокислого (облік Д через 14 діб), МРС-бульйон без амонію лимоннокислого, але з 0,3% L-аргініна, капустний бульйон, середовище по Байсету і Девісу з рН 7,4 (табл. 2.4) [28].

Середовище з аргініном тричі стерилізують текучою парою. Засіяне середовище інкубують протягом 10 днів при температурі 37 °С [28].

Склад поживного середовища по Байсету і Девісу

Компоненти	Вміст, %
Пептон	0,5
Глюкоза	0,3
Дріжджовий екстракт	0,3
Оцтовокислий натрій	1,0
L -аргінін солянокислий	0,3
Твін 80	0,1
Сіль А	0,5
Сіль Б	0,5

Катсарас пропонує вивчати утворення аміаку з аргініна на середовищі з рН 6,4, склад якого викладений в таблиці 2.5. Середовище розливають по 1 мл, стерилізують при 120 °С 15 хв, і після засіву однією краплею 18-годинної культури на поверхню середовища наносять стерильну вазелінову олію. У випадку позитивної реакції воно забарвлюється в синьо-фіолетовий колір [28].

Таблиця 2.5

Склад поживного середовища по Катсарасу

Компоненти	Вміст,
Пептон	5 г
Аргінін	10 г
М'ясний екстракт	5 г
Піридоксаль	0,005 г
Водний розчин бромкрезолового пурпурного (1:500)	5 мл
Водний розчин крезолового червоного (1:500)	2,5 мл
Глюкоза	0,5 г
Дистильована вода	1 л

Потрібно мати на увазі, що при наявності в середовищах 2% глюкози аміак з аргініну утворюють тільки гетероферментативні палички, якщо ж глюкози менше, то цю властивість проявляють і гомоферментативні бактерії [28].

2.2.7. Методика визначення каталазної активності

Для визначення каталазної активності на предметне скло наносять краплю 3%-го перекису водню, в ній суспендують тест-культуру. Або ж можна нанести розчин перекису водню на поверхню поживного середовища в чашці Петрі з колоніями бактерій, які на ньому вирости [29].

Каталаза, яка продукується бактеріями, буде розкладати перекис водню на воду та кисень, який виділяється у вигляді бульбашок. Якщо бактерії володіють каталазною активністю, то спостерігається бурхливе газоутворення через 1–5 хв після внесення бактерій, якщо ні — газ не виділяється [29].

Лактобацили не мають каталази, тому утворення газу в пробі з перекисом водню не спостерігається. В якості позитивного К можна взяти каталазно-позитивні бактерії *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* [29].

2.2.8. Методика визначення протеолітичної активності

Протеолітичну активність визначають методом, що ґрунтується на визначенні тирозину, що утворюється в результаті гідролізу білка, з реактивом Фоліна. За одиницю протеолітичної активності беруть здатність ферменту каталізувати гідроліз 1 г білка (казеїну) за чітко визначених умов: температура 40 °С, рН 10,5, тривалість гідролізу 1 год. Активність позаклітинної лужної протеази при рН 10,5 визначають через 24, 48, 72 та 96 год вирощування мікроорганізмів [5].

Реактив Фоліна-Чокольга. У кругло донну колбу поміщають 70 мл води, 10 г натрію вольфрамату, 2,5 г кислоти фосфорномолібденової, 5 мл кислоти ортофосфорної, кип'ятять зі зворотнім холодильником 2 год, потім охолоджують, розводять водою до 100 мл, добре перемішують. Зберігають в ємностях помаранчевого скла з притертими пробками. ТУ 6-09-938-77 [27].

У три пробірки, одна з яких є контрольною, наливають по 5 см³ 1%-го розчину казеїну та витримують за температури 40 °С впродовж 5 хв. У першу (контрольну) пробірку додають 2,5 см³ дистильованої води, у решту — по 2,5 см³ культуральної

рідини. Вміст пробірок ретельно перемішують та витримують протягом 60 хв за температури 40 °С. Після завершення гідролізу в кожен з пробірок додають по 5 см³ 0,3 М розчину ТХО, щоб зупинити ферментативну реакцію та осадити білок і високомолекулярні продукти гідролізу [5].

Суміш швидко перемішують та для повноти осадження білка витримують 15 хв за температури 40 °С. Розчини фільтрують через фільтрувальний папір та у фільтраті визначають кількість прогідролізованого білка за тирозином. Для цього беруть три пробірки і в кожен, починаючи з першої (К), наливають по 2 см³ фільтрату, повільно додають по 5 см³ 0,5 М розчину вуглекислого натрію та по 1 см³ робочого реактиву Фоліна (основний реактив Фоліна розводять безпосередньо перед аналізом у співвідношенні 1:3), безперервно перемішують, витримують (для розвитку забарвлення) за температури 40 °С впродовж 30 хв, охолоджують до кімнатної температури і визначають оптичну густину за довжини хвилі 630-670 нм та довжини світлового шляху 5мм. Оптичну густину досліджуваних зразків вимірюють відносно К проби. Значення оптичної густини має становити 0,15-0,70 [5].

Протеолітичну активність (ПС), од/см³, розраховують за формулою (2.1):

$$ПС = \frac{4,7D+0,1}{m} 1000, \quad (2.1)$$

де D — оптична густина досліджуваного розчину; m — об'єм культуральної рідини, см³; 4,7 та 0,1 — сталі коефіцієнти, встановлені експериментально, г/год; 1000 — коефіцієнт для переведення кубічних сантиметрів у кубічні дециметри [5].

2.2.9. Методика визначення активності кислотоутворення

Активність кислотоутворення визначають титриметричним методом. Добові культури лактобактерій центрифугують та за оптичним стандартом мутності готують суспензію 1 млрд кл/см³ у фізіологічному розчині. По 1 см³ такої суспензії вносять у пробірки з 9 см³ середовища МРС та культивують за температури 37 °С в анаеробних умовах упродовж 24-48 год. З кожної пробірки відбирають по 5 см³

суспензії та титрують розчином 0,1 н гідроксиду натрію за наявності індикатора фенолфталеїну до появи слабо-рожевого кольору. Показник активності кислотоутворення виражають у градусах Тернера (°Т) і визначають за формулою (2.2) [30]:

$$T = AK \cdot 20, \quad (2.2)$$

де T — об'єм 0,1 н лугу на титрування 100 см³ досліджуваного зразка, см³; A — об'єм 0,1 н лугу на титрування 5 см³ суспензії, см³; K — коефіцієнт, що визначається при титруванні 0,1 н розчину лугу 0,1 н бурштиною кислотою [30].

2.2.10. Методика визначення росту молочнокислих бактерій при різних температурах

Лактобацили відносять до трьох підродів на основі їх здатності рости при різних температурах. Ця здатність часто є одним з найбільш надійних ознак для попередньої класифікації виділених штамів [29].

Щоб уникнути невірних результатів, досліди слід проводити в добре закритих резиновими пробками чи колпачками пробірках у водяній бані, щоб попередити випаровування середовища і його поверхнєве охолодження. Використовують рідкі середовища за прописами Брігс, МРС бульйон, середовище №1 по Кедді, капустний бульйон. Їх розливають по 10 мл в пробірки, засівають, використовуючи рясний інокулянт, та інкубують при температурі 15 °С протягом 2-3 неділей, а при 45-48 °С — 4-7 днів. Для встановлення температурного оптимуму росту штами культивують протягом 15 год. Встановлюючи наявність росту бактерій при різних температурах, треба уточнити такі поняття, як «розвиток» або «ріст». Продукування кислоти, утворення мутності — це не синонімічні значення. Помутніння середовища після інкубації культури в підходящому середовищі протягом, наприклад, двох неділей може бути позначено як ріст. У тей же час значне утворення кислоти і зниження рН середовища, наприклад, до 5,3 і нижче в адекватному середовищі з глюкозою може

бути практичним тестом розвитку, хоча відсутність кислотонакопичення ще не є показником відсутності росту [29].

2.2.11. Визначення біомаси ваговим методом

Метод широко застосовують у виробничих та дослідних лабораторіях для непрямого визначення кількості мікроорганізмів у вигляді сухої чи сирої біомаси. Кількість біомаси зазвичай виражають в грамах чи міліграмах на літр середовища [31].

Висушування центрифужних пробірок (бюксів) та фільтрів до постійної маси. Фільтри, вкладені у відкриті чашки Петрі, центрифужні пробірки та бюкси поміщають у сушильну шафу та витримують протягом 1 год при температурі 100-105 °С. Потім їх переносять в ексікатори з безводним хлоридом кальцію чи концентрованою сірчаною кислотою. Чашки з фільтрами при цьому тримають закритими. Після охолодження в ексікаторі протягом 30 хв центрифужні пробірки (бюкси, фільтри) зважують на аналітичних вагах з точністю до 0,0001 г. Висушування в сушильній шафі та охолодження в ексікаторі проводять кілька разів, поки маса пробірки (бюкса) чи фільтра не досягне постійного значення і різниця при повторному зважуванні не буде перевищувати $\pm 0,0001$ г [31].

Центрифугування клітин мікроорганізмів. Бактеріальні та дріжджові клітини відділяють від культуральної рідини центрифугуванням. Для цього точно відміряний піпеткою об'єм ретельно перемішаної культури наливають у висушені центрифужні пробірки. Час центрифугування та число обертів залежать від розмірів клітин. Бактерії центрифугують 15-20 хв при 5-7 тис. об/хв, дріжджі — 5-10 хв при 3,5-4,0 тис. об/хв. Надосадову рідину обережно зливають, осад 1-2 рази промивають фізіологічним розчином або злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на літр води) і знову центрифугують при тому ж числі обертів. Після закінчення промивки воду зливають, осад залишають у центрифужній пробірці, якщо вона виготовлена зі скла. З поліетиленових пробірок осад

дистильованою водою кількісно переносять в попередньо висушений скляний бюкс [31].

Клітини міцеліальних грибів та актиноміцетів, а також дріжджів і бактерій можна відділяти від культуральної рідини, використовуючи обеззолені паперові чи мембранні фільтри. Подвійні паперові фільтри поміщають в скляні воронки чи воронки Бюхнера та фільтрують точно відміряний об'єм культури. Мутний фільтрат кілька разів повертають на фільтр. Для пришвидшення процесу фільтрацію можна вести під вакуумом. Осад на фільтрі ретельно промивають підкисленою дистильованою водою. Мембранні фільтри використовують для відділення бактеріальних клітин і підбирають таким чином, щоб розмір пор фільтрів був менший за розмір бактерій [31].

Визначення маси клітин. Центрифужні пробірки (бюкси) чи фільтри з осадом клітин мікроорганізмів поміщають в сушильну шафу та висушують 2 год при температурі 30 °С, потім при 100-105 °С. Перше зважування проводять через 4 год, інші — через 1 год. Перед кожним зважуванням пробірки, бюкси і фільтри охолоджують в ексикаторі. Для пришвидшення процесу висушування використовують вакуум-сушильні шафи з примусовою вентиляцією, лампи інфра-червоного випромінювання. Біомасу на фільтрах можна швидко висушити в приладі К.Н. Чижової. В основу його конструкції покладений принцип зневоднення протягом 5-7 хв при температурі нагріву 160 °С тонкого шару досліджуваного зразка інфра-червоними променями, що виходять від темного нагрітого тіла [31].

Кількість сухої біомаси в г/л розраховують за формулою (2.3):

$$x = A - B \frac{1000}{V}, \quad (2.3)$$

де A і B — маса центрифужної пробірки (бюкса, фільтра) з осадом і без осаду, г; V — об'єм культуральної рідини, взятої для центрифугування чи фільтрування, мл.

Біомасу ваговим методом визначають в двох паралельних пробах [31].

2.3. Висновки до розділу

У коренеплодах цикорію міститься 16–24 % інуліну, який сприяє виведенню з організму радіонуклідів та токсинів, 2,5 % фруктового цукру, 1,2 % білків, 0,6 % жирів, вітаміни А, В1, В2, В12, РР та більше 30 мінеральних елементів. Тому було прийнято рішення дослідити цикорій в якості джерела вуглецю у поживних середовищах капустиному та MRS без глюкози. У розділі було розглянуто такі методики проведення експериментів, як отримання накопичувальної і чистої культур, визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacillus*, мікроскопію лактобацил, відновлення нітратів в нітрити, утворення аміаку з аргініну, каталазної та протеолітичної активностей, активності кислотоутворення, визначення росту молочнокислих бактерій при різних температурах та визначення біомаси ваговим методом.

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Вдосконалена технологія виробництва дієтичної добавки «Ліпогрейд»

Технологія виробництва дієтичної добавки «Ліпогрейд» включає в себе такі стадії, як отримання посівного матеріалу, процес ферментації, стабілізація культуральної рідини, заморожування препарату, сублімаційне сушіння, змішування з полікозанолом та наповнення капсул (рис. А.1). Розглянемо детальніше кожен етап [5].

Отримання посівного матеріалу. Інокулянт отримують у результаті двох послідовних пересівів (культура I і II генерації) робочої культури *L. plantarum* на рідкому середовищі МРС [5].

Для отримання культури I генерації використовують ампули з ліофілізованою робочою лактобактерій (10^8 – 10^9 КУО/см³), у які вносять фізіологічний розчин хлориду натрію (1 см³ на дозу), ретельно перемішують і переносять у колби з поживним середовищем МРС. Культуру лактобактерій вирощують у термостаті за температури (37 ± 1) °С упродовж 24 год за періодичного перемішування [5].

Мікробіологічний контроль культури I генерації здійснюють мікроскопіюванням, а також висівом на МПА з 5% глюкози й агаризоване середовище Сабуро (для виявлення сторонньої бактеріальної і грибною мікрофлори відповідно). Посіви на МПА витримують у термостаті за температури (38 ± 1) °С упродовж 48 год, на середовищі Сабуро — за (22 ± 1) °С протягом 72 год. Якщо сторонньої мікрофлори немає, то культуру I генерації використовують як посівний матеріал для отримання культури II генерації, збільшуючи об'єм середовища МРС у десять разів. Через 24 год здійснюють мікробіологічний контроль як описано вище, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха на агаризованому середовищі МРС (має бути не нижче, ніж 10^9 КУО/см³) [5].

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері на середовищі з цикорієм за таких параметрів культивування: температура (37 ± 1) °С; рН 6,8-7,0 (регулюють 5%-им розчином аміаку); надлишковий тиск 0,03-0,04 МПа; тривалість 8-10 год. Упродовж процесу біосинтезу періодично (щогодини на 10 хв) вмикають перемішувальний пристрій (70 об/хв), а також двічі (як правило, через 2 і 5-6 год культивування) у ферментер подають стерильний розчин глюкози до кінцевої концентрації у середовищі 1,5-1,7 % [5].

Через кожні 2 год культивування з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин. Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації лактобактерій на рівні 10^9 КУО/см³ [5].

Стабілізація культуральної рідини. До культуральної рідини, одержаній на попередній стадії, додають захисне сахарозо-молочне середовище та розчин желатози (гідролізований розчин желатину) і встановлюють рН 6,0-6,5 5%-им розчином аміаку, отримуючи напівфабрикат Ліпогрейду. На цій стадії обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль напівфабрикату на відсутність сторонньої мікрофлори [5].

Для приготування сахарозо-молочного середовища знежирене молоко фільтрують для видалення механічних вкраплень, доводять рН до 7,4-7,6 (розчином аміаку) стерилізують за температури 121 °С впродовж 45 хв, охолоджують до 36-40 °С, додають сахарозу до кінцевої концентрації 30-32 %, після чого знову стерилізують. Стерильність сахарозо-молочного середовища перевіряють висівом на МПА і середовище Сабуро як описано вище [5].

Щоб отримати розчин желатози, до сухого желатину додають дистильовану воду з розрахунку 1 дм³ води на 90-100 г желатину. Розчин ретельно перемішують і залишають для набухання за кімнатної температури на 3 год, після чого підігрівають на водяній бані (50-60 °С) до повного розчинення желатину і стерилізують.

Сублімаційне сушіння напівфабрикату Ліпогрейду. Цей етап складається із двох стадій: заморожування і сублімаційного сушіння [5].

Отриману культуральну рідину поміщають у піддони (лотки, касети). Потім заморожують за температури $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ упродовж 18-24 год (залежно від завантаження апарата) [5].

Сублімаційне сушіння замороженого препарату здійснюють під вакуумом (26,6 Па). Через 40 год після початку процесу сушіння починають плавне підігрівання полиць сублімаційної установки на $1-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ за годину до досягнення температури $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, після чого збільшують підігрівання на $2-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ за годину до досягнення температури $32-34\text{ }^{\circ}\text{C}$. За цієї температури Ліпогрейд витримують приблизно 6 год. Процес сушіння триває близько 80 год [5].

Капсулювання. Суху мікробну масу подрібнюють, додають допоміжні речовини (целюлозу мікрокристалічну, кросповідон, кремнію діоксид, натрію цитрат, магнію стеарат, цукор кристалічний) та полікозанол. Визначають кількість живих лактобактерій для формування маси капсул. Потім здійснюють процес капсулювання. Капсули передають на фасування.

Готовий препарат Ліпогрейд контролюють за показниками згідно з АНД (ГСТУ 42-01-07) [5].

До фізико-хімічних досліджень належать:

- розчинність (згідно ДФУ, вид. 3, п.2.9.3);
- потенціометричне визначення рН (згідно ДФУ, вид. 2, п. 2.2.3);
- втрата в масі при висушуванні (згідно ДФУ, вид. 2, п. 2.2.32);
- визначення оптичної густини (згідно ДФУ, вид. 2, п. 2.2.25);
- визначення амінного азоту формульним титруванням (алкаметрія за методом Серенсена).

До біологічних методів досліджень належать:

- мікробіологічна чистота (згідно ДФУ, вид. 2, п. 2.6.12, п. 2.6.13);
- бактеріоскопічний контроль (технологія забарвлення зразків за Грамом);
- кількість живих лактобацил;
- визначення активності кислотоутворення (титриметричним методом);
- антагоністична активність;
- специфічна нешкідливість;

- адгезивна активність (метод фотоколориметрії);
- імуностимулююча активність продуктів метаболізму бактерій;
- антибактеріальна активність продуктів метаболізму бактерій.

До фармакотехнологічних досліджень належать:

- плинність (згідно ДФУ, вид. 2, 2.9.16);
- кут природнього укусу, насипний об'єм (згідно ДФУ, вид 1, п. 2.9.15);
- однорідність маси (згідно ДФУ, вид. 2, 2.9.5);
- розпадання (згідно ДФУ, вид. 2, 2.9.1);
- розчинення (згідно ДФУ, вид. 2, 2.9.3).

3.2. Аналіз отриманих результатів дослідження

3.2.1. Виділення чистої культури *L. plantarum*

Виділення культури молочнокислих бактерій з ДД «Ліпогрейд» проводили спочатку на рідкому середовищі MRS. Для цього в пробірку з цим середовищем висипали стерильно вміст капсули ДД «Ліпогрейд». Через 48 год спостерігався білий осад, що свідчить про ріст культури.

Цю культуру з рідкого середовища MRS було пересіяно на щільне це ж середовище. Через 48 год культивування при температурі 37 °С на чашках з агаризованим MRS виростили круглі випуклі гладенькі білі колонії з рівними краями, непрозорі, не пігментовані, які мають діаметр 1,5-2 мм (рис. 3.1 А).

Щоб довести, що виділена культура належить до молочнокислих бактерій, було проведено мікроскопування. При фарбуванні препарату за Грамом культура мала рожевий колір (молочнокислі бактерії забарвлюються в фіолетовий). Це свідчить про те, що культура застаріла, тому клітинна стінка бактерій змінилася. Також препарат було пофарбовано барвником метиленовим синім (рис. 3.1 В). Під світловим мікроскопом добре видно, що клітини мають форму паличок із закругленими кінцями, прямі, зустрічаються короткими ланцюжками.

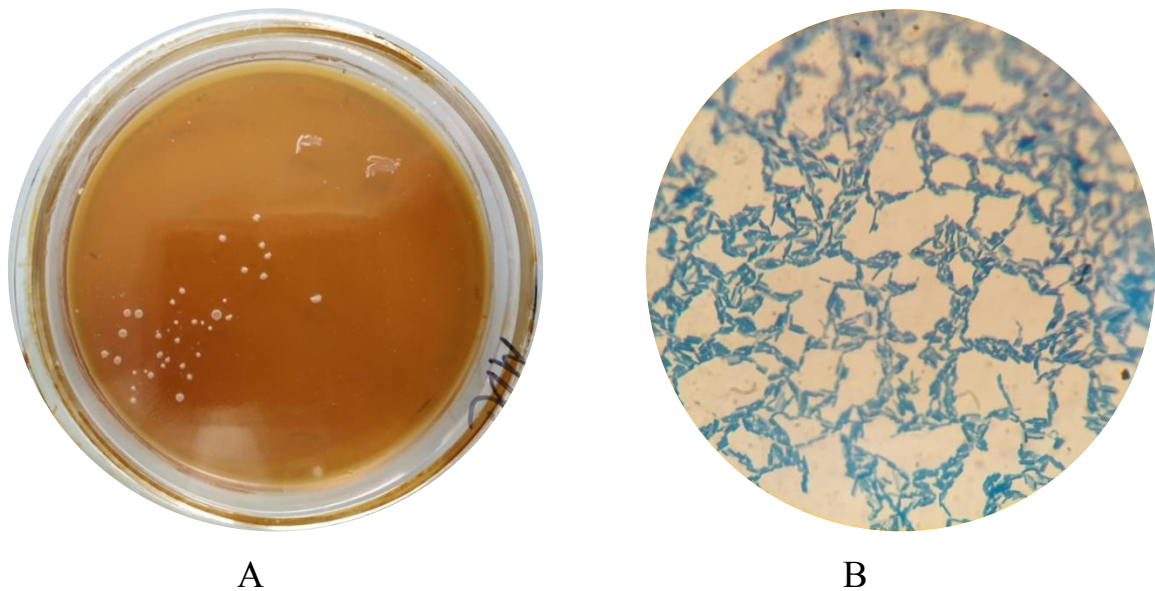


Рис. 3.1. Культура *L. plantarum*: А — колонії на агаризованому середовищі MRS; В — клітини під світловим мікроскопом, $\times 1350$

Виділену чисту культуру накопичили в колбі на рідкому поживному середовищі MRS. Далі вона в якості посівного матеріалу в кількості 5 % від об'єму поживного середовища була посіяна стерильними піпетками на рідкі поживні середовища MRS та капустяне. При чому для кожного середовища був К (глюкоза) та дослідна проба з цикорієм замість глюкози. У всіх колбах спостерігався білий осад молочнокислих бактерій після 48 годин культивування при температурі 37 °С.

3.2.2. Результати якісних реакцій

Лактобацили не мають каталази, тому утворення газу в пробі з перекисом водню не спостерігається Реакція на відновлення нітрати в нітрити негативна, що і притаманно молочнокислим бактеріям. Реакція на утворення аміаку з аргініном позитивна, про що свідчить утворення помаранчевого кольору. Реакція на протеолітичну активність позитивна, про що свідчить посиніння розчину в порівнянні з К (водою).

Результати визначення каталазної і протеолітичної активностей, відновлення нітратів в нітрити та утворення аміаку з аргініну бактеріями *L. plantarum* наведені в таблиці 3.1.

Визначення каталазної і протеолітичної активностей, відновлення нітратів в нітрити та утворення аміаку з аргініну бактеріями *L. plantarum*

Поживне середовище	Показники			
	Каталазна активність	Відновлення нітратів в нітрити	Утворення аміаку з аргініну	Протеолітична активність, од/см ³
MRS (контроль)	-	-	+	2873,2
MRS + цикорій (дослід)	-	-	+	3224,7
Капустяне середовище (контроль)	-	-	+	1996,5
Капустяне середовище + цикорій (дослід)	-	-	+	2250,9

З таблиці видно, що цикорій не впливає ні в середовищі MRS, ні в капустяному негативно на такі показники, як каталазна активність, відновлення нітратів в нітрити, утворення аргініну, а також покращує протеолітичну активність в порівнянні з контролем приблизно на 13 %.

3.2.3. Активність кислотоутворення, оптимальна температура росту та рН в залежності від часу культивування *L. plantarum*

Результати залежності активності кислотоутворення від температури та часу культивування *L. plantarum* на рідкому капустяному поживному середовищі занесені до табл. 3.2. Також вони представлені на графіках, на яких виведено рівняння цієї залежності, тобто модель (рис. 3.2 і 3.3). Графіки і модель були зроблені в програмі *Statistica*. За рівнянням на графіках можна вирахувати значення активності кислотоутворення бактеріями *L. plantarum* в певний період часу та при певній температурі їх культивування.

З малюнків видно, що активність кислотоутворення найвища за температури культивування 35 °С і часу культивування 45 год.

Таблиця 3.2

Результати залежності активності кислотоутворення від температури та часу культивування *L. plantarum* на капустиному середовищі

Час культивування, год	Температура культивування, °С	Активність кислотоутворення КС (К), °Т	Активність кислотоутворення КС+ц (Д), °Т
25	20	94	99
30	20	97	108
45	20	105	110
25	35	126	141
30	35	132	145
45	35	143	150
25	40	120	139
30	40	118	132
45	40	112	128

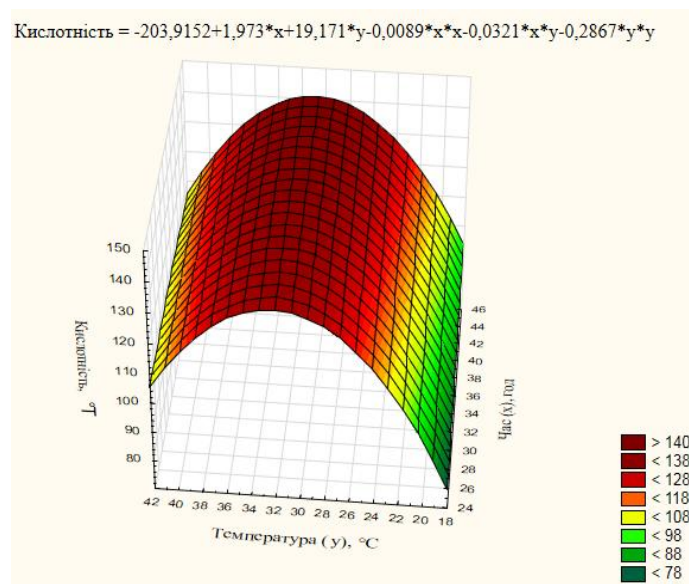


Рис. 3.2. Модель залежності активності кислотоутворення від часу та температури культивування *L. plantarum* на капустиному середовищі (контроль)

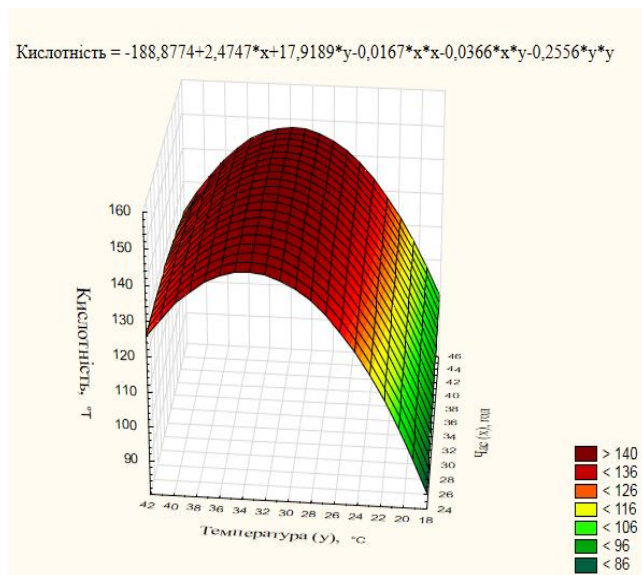


Рис. 3.3. Модель залежності активності кислотоутворення від часу та температури культивування *L. plantarum* на капустиному середовищі з цикорієм (дослід)

Результати динаміки рН середовищ залежно від часу культивування *L. plantarum* занесені до табл. 3.3 та відображені на рис. 3.4 і 3.5.

Таблиця 3.3

Результати динаміки рН капустиного середовища залежно від часу культивування *L. plantarum*

Час культивування, год	рН КС (К)	рН КС+ц (Д)	рН MRS (К)	рН MRS+ц (Д)
5	6,12	6,07	6,42	6,46
10	5,84	5,68	6,23	6,13
20	5,45	5,28	5,86	5,75
30	5,02	4,96	5,34	5,23
40	4,64	4,52	4,91	4,79
50	4,38	4,25	4,62	4,37

рН середовищ, що містять цикорій майже однаковий з К, але на кілька значень нижче, що свідчить про кращу кислотоутворюваність лактобактеріями.

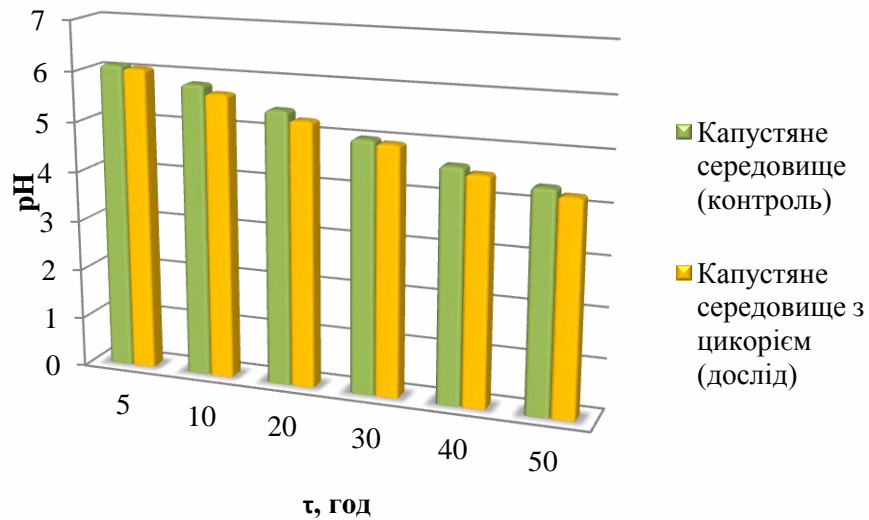


Рис. 3.4. Діаграма залежності рН від часу культивування *L. plantarum* на капустяному середовищі

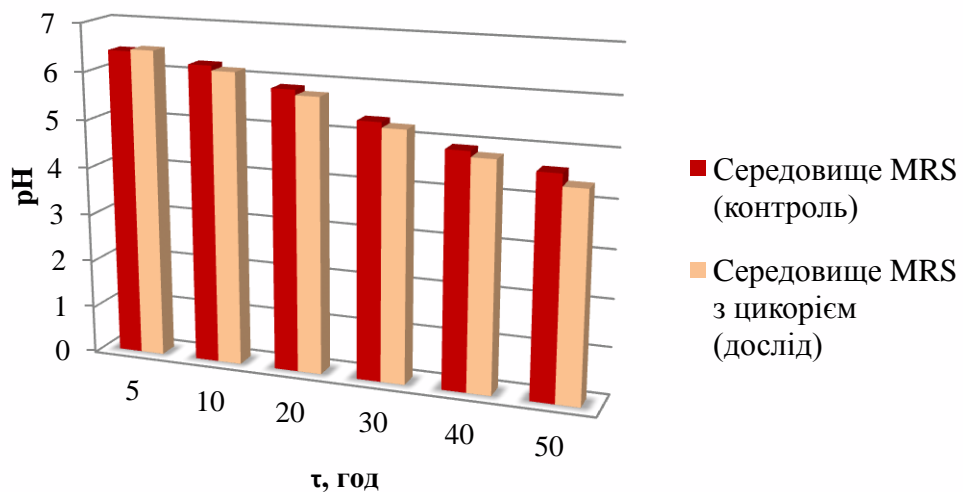


Рис. 3.5. Діаграма залежності рН від часу культивування *L. plantarum* на середовищі MRS

3.2.4. Результати визначення біомаси

При 48 годинному культивуванні бактерій *L. plantarum* на поживних середовищах з цикорієм і без нього періодично перевірялись значення оптичної густини культуральної рідини, результати якої занесені до табл. 3.4 і відображені на рис. 3.6 і 3.7.

Динаміка оптичної густини середовищ залежно від часу культивування *L. plantarum*

Час культивування, год	Оптична густина КС (К)	Оптична густина КС+ц (Д)	Оптична густина MRS (К)	Оптична густина MRS +ц (Д)
5	0,175	0,196	0,124	0,134
10	0,215	0,256	0,3	0,381
20	0,499	0,598	0,512	0,791
30	0,721	0,8	0,897	1,096
40	0,988	0,923	1,21	1,578
50	1,075	1,179	1,589	2,115

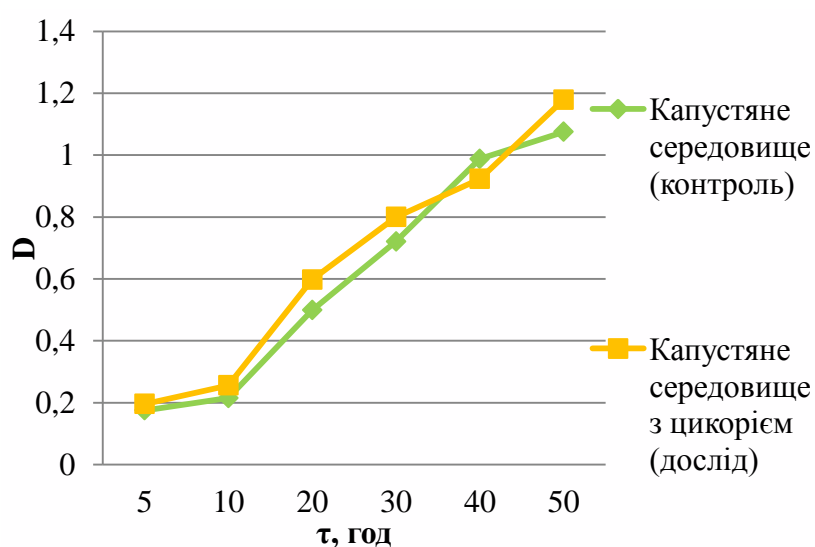


Рис. 3.6. Динаміка оптичної густини капустианих середовищ з і без цикорію

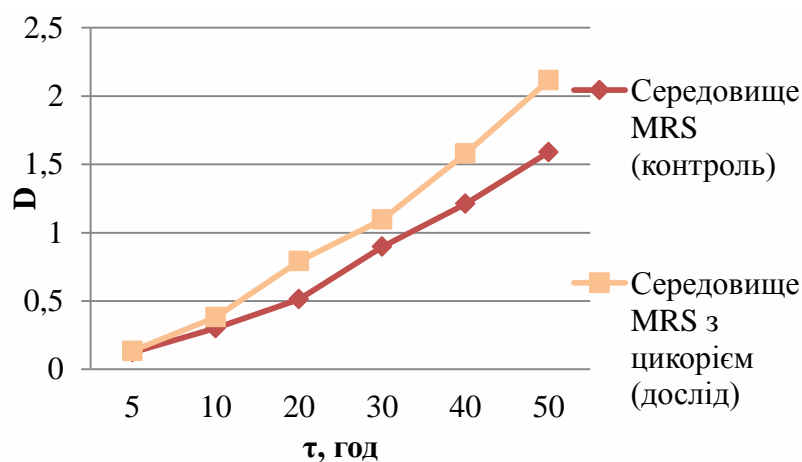


Рис. 3.7. Динаміка оптичної густини середовищ MRS з і без цикорію

З графіків видно, що поживні середовища з цикорієм замість глюкози в порівнянні з К мають дещо вищі значення оптичної густини. Тобто цикорій покращує оптичну густину культуральної рідини.

Сушу біомасу розраховували ваговим методом. Ефективність накопичення біомаси на середовищі з цикорієм після 48 годинного культивування *L. plantarum* подана в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Ефективність накопичення біомаси на середовищі з цикорієм після 48 годинного культивування *L. plantarum*

Середовище культивування	Показники інтенсивності накопичення біомаси		
	Суша біомаса, г/л	Оптична густина	Кислотність, °Т
MRS (контроль)	5,4 ± 0,25	1,589	195
MRS + цикорій (дослід)	5,5 ± 0,5	2,115	201
Капустяне середовище (контроль)	4,3 ± 0,25	1,075	112
Капустяне середовище + цикорій (дослід)	4,5 ± 0,14	1,179	128

З таблиці видно, що при культивуванні *L. plantarum* на поживному середовищі з цикорієм вміст сухої біомаси майже на 5% більший порівняно з К, а кислотність більша на 14% в порівнянні з К.

3.3. Висновки до розділу

При культивуванні *L. plantarum* на поживному середовищі з цикорієм вміст сухої біомаси майже на 5% більший порівняно з контролем, а кислотність більша на 14% в порівнянні з контролем. Заміна глюкози на цикорій в поживному середовищі покращує протеолітичну активність на 13% та не впливає негативно на такі показники, як каталазна активність, відновлення нітратів в нітрити, утворення аміаку з аргініну. Тому використання цикорію в якості джерела вуглецю можливе.

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів

Виробництво пробіотичних препаратів є складним процесом, і при виконанні робіт у виробничій лабораторії на працівників можуть впливати такі небезпечні та шкідливі виробничі фактори (згідно ГОСТ 12.0.003-74), як [39]:

- понижена або підвищена температура обладнання та матеріалів;
- мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності;
- хімічний;
- понижена рухомість повітря;
- недостатня освітленість робочої зони;
- підвищений рівень ультрафіолетової радіації.

В лабораторії досить багато обладнання, яке під час роботи має властивість нагріватися, підвищуючи цим температуру повітря робочої зони. До такого обладнання відносять термостати, сухо жарові шафи, автоклави, центрифуги, ферментери та інокулятори, також трубопроводи пару та води. Усі теплові апарати, паропроводи, устаткування, що випромінюють тепло, повинні мати ефективну та надійну теплову ізоляцію згідно з вимогами СНиП 2.04.14-88. Температура зовнішніх поверхонь устаткування, що випромінює тепло, не повинна перевищувати 43 °С згідно з вимогами ДСТУ EN 563-2001 [39, 33].

У виробничій лабораторії можливе забруднення повітря робочих приміщень, одягу персоналу, поверхонь та обладнання мікроорганізми та продуктами їхньої життєдіяльності. Це відбувається під час контролю відібраних проб, виділення чистої культури, а також із зразків, чашок Петрі та колб, які відправляються на утилізацію. Максимальна гранично допустима концентрація мікроорганізмів-продуцентів в повітрі робочої зони обмежуються величиною $5 \cdot 10^4$ КУО/м³ згідно Наказу МОЗ №521 від

26.10.2004 року про затвердження методичних вказівок «Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів» [34].

Повітря робочої зони також забруднюється хімічними речовинами, що використовуються при аналізі, а також виробляються мікроорганізмами. Правила організації роботи в лабораторії, зокрема з мікроорганізмами повинні відбуватися відповідно до ДСП 9.9.5.-080-02. Нормованими показниками концентрації хімічних речовин у повітрі робочої зони є граничнодопустима максимальна разова концентрація $ГДК_{р.з.м.р}$ і граничнодопустима середньозмінна концентрація $ГДК_{р.з.с.з}$ у повітрі робочої зони працівника. Граничнодопустимі значення максимальної разової і середньозмінної концентрації шкідливих хімічних речовин визначені ГОСТ 12.1.005-88 [41].

Мікроклімат виробничих приміщень і його стан у робочій зоні – головні фактори, що обумовлюють умови праці. На працездатність працівників та ступінь чистоти повітря робочої зони можуть впливати повітряні течії. Швидкість руху повітря регулюється природною й штучною вентиляцією. У робочій зоні виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99 встановлює норми температури, відносної вологості й швидкості руху повітря в теплий, холодний і перехідний періоди року, виходячи з категорії роботи щодо важкості, призначення приміщень, надлишків тепла [45].

Якщо швидкість повітряного потоку занадто низька (норма 0,1 м/с), то утворюються застійні зони, де збираються шкідливі виділення (гази, волога, пил, пар). Будь-яка схема вентиляції повинна передбачати одночасно приплив зовнішнього повітря і витяжку відпрацьованого, забезпечуючи цим баланс повітря в приміщенні [38].

Недостатня або надмірна освітленість робочої зони і робочих місць, нерівномірність освітлення втомлює очі, призводить до зниження продуктивності праці; при цьому зростає потенційна небезпека помилкових дій і нещасних випадків.

Природне освітлення має велике гігієнічне значення. Санітарні норми передбачають обов'язкове безпосереднє природне освітлення виробничих, адміністративних, підсобних і побутових приміщень [41].

Штучне освітлення передбачається у всіх виробничих та побутових приміщеннях з недостатнім природним освітленням, а також для освітлення приміщень в темний період доби. Найменша освітленість у виробничих приміщеннях регламентується ДБН В.2.5-28-2006 і визначається характеристикою зорової роботи. Як джерело штучного освітлення широко використовують лампи розжарювання та газорозрядні лампи [42].

Ультрафіолетове випромінювання виникає при роботі ртутно-кварцових ламп для стерилізації лабораторних приміщень. Ультрафіолетові бактерицидні лампи повинні використовуватися в приміщеннях з високим та середнім рівнем контамінації мікобактеріями та при великих скупченнях людей. Оцінка ультрафіолетового випромінювання здійснюється за величиною еритемної дози. Для профілактики достатньо 1/10 еритемної дози, тобто 60-90 мБер хв/см². Бактерицидна дія УФ-випромінювання, тобто здатність вбивати хвороботворні мікроби, залежить від довжини хвилі: УФ-промені з довжиною хвилі 254-257 нм мають максимальний бактерицидний ефект [35].

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів

Засоби захисту від високих і низьких температур обладнання та матеріалів — огороження, автоматичне дистанційне керування, термоізоляція, спеціальний захисний одяг, сигналізація, знаки безпеки [38]. Також все лабораторне обладнання, яке є джерелом тепла повинно забезпечуватися пристроями, що різко обмежують виділення конвекційного і променистого тепла в виробниче приміщення.

Засобами захисту від патогенних мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності є герметизація, розділення приміщення на зони, дезінфекція

приміщення, вентиляція та очистка повітря, спеціальний захисний одяг, рукавички, засоби індивідуального захисту органів дихання згідно вимог ГОСТ 12.4.011-89 [47].

Згідно Наказу № 627 Міністерства надзвичайних ситуацій України "Про затвердження вимог до роботодавців щодо захисту працівників від шкідливого впливу хімічних речовин" від 22.03.2012 суб'єкт господарювання повинен вжити **заходів для виключення або зменшення до мінімуму шкідливого впливу хімічних речовин** шляхом:

- запровадження способів ведення робіт, які не призводили б до перевищення граничнодопустимих концентрацій шкідливих хімічних речовин;
- забезпечення працівників засобами колективного захисту (огороження, вентиляція, герметизація тощо) і ефективного їх використання;
- забезпечення працівників необхідними засобами індивідуального захисту згідно з НПАОП 24.0-3.01-04 та НПАОП 24.0-3.03-07;
- скорочення до мінімуму кількості працівників, що піддаються або можуть бути піддані впливу шкідливих хімічних речовин;
- скорочення до мінімуму тривалості і інтенсивності впливу хімічних речовин на працівників;
- здійснення необхідних заходів особистої гігієни;
- зменшення до мінімуму, необхідного для виконання робіт, кількості хімічних речовин на робочих місцях;
- застосування спеціальних пристроїв для безпечного оброблення, зберігання, нейтралізації, знезараження і переміщення в межах робочих місць шкідливих хімічних речовин і відходів, що містять такі речовини [42].

До засобів захисту, а також нормалізації повітряного середовища відносяться вентиляція, кондиціонування та опалення, автоматичний контроль. Повітря повинно подаватися та відводитися через бактеріальні фільтри, очищаючись від шкідливих речовин. Вентиляція повинна здійснюватися за допомогою припливно-витяжної системи відповідно до ДБН В.2.5-67:2013 та ДСН 3.3.6.042-99 [43].

Системи вентиляції та опалення повинні забезпечувати відповідні параметри **мікроклімату**. В умовах жаркого клімату в робочих кімнатах та боксах

встановлюються кондиціонери. Під час роботи з біологічним матеріалом їх вимикають. Для лабораторій мікробіологічного профілю слід передбачати системи припливно-витяжної вентиляції, які відповідають СНіП 2.04.05-91, ДСН 3.3.6.042-99. В усіх лабораторіях, що будуються або реконструюються, необхідно передбачати обладнання автономної припливно-витяжної вентиляції з встановленням фільтрів тонкого очищення повітря, що викидається із зараженої зони (або обладнання цих приміщень боксами біологічної безпеки). Магістральні короби припливно-витяжної вентиляції, електричних, водопровідних, каналізаційних мереж розмішуються у спеціальних нішах коридорів, щоб забезпечити вільний доступ до них під час профілактичного огляду [44].

Засобами захисту та нормалізації світла виробничих приміщень є світлофільтри, світлозахисні механізми, засоби індивідуального захисту очей. Виробнича лабораторія та всі суміжні до неї приміщення повинні мати природне та штучне освітлення, яке відповідає вимогам ДБН В 2.5.–28– 2006. Найменша освітленість робочих поверхонь у виробничих приміщеннях регламентується ДБН В.2.5-28-2006 [43].

Засоби захисту від підвищеного рівня ультрафіолетового випромінювання включають такі пристрої, як вентиляційні, огорожувальні (екрани), автоматичного контролю і керування, дистанційного керування. Від ультрафіолетового випромінювання застосовують захист відстанню – віддалення робочого місця від джерел випромінювання, захисні екрани, ширми, фарбування у світлі тони для більшого відображення променів. Як засоби індивідуального захисту застосовують захисний одяг, взуття, рукавички, головні убори. Шкіру захищають нанесенням спеціальної мазі, що містить салол саліцилово-метиловий ефір тощо. Очі захищають окулярами, щитками зі світлофільтрами в залежності від інтенсивності випромінювання [36].

4.2.1. Розрахунок безпечного перебування людини у приміщенні з увімкненою лампою ультрафіолетового опромінення

Ультрафіолетове бактерицидне опромінення повітряного середовища приміщення, що здійснюється за допомогою ультрафіолетових бактерицидних ламп є санітарно-протиепідемічним заходом, спрямованим на зниження кількості мікроорганізмів [36].

Приміщення з ультрафіолетовими бактерицидними лампами можна поділити на дві групи:

- знезараження відбувається у присутності людей протягом робочого дня;
- знезараження повітря здійснюють при відсутності людей [35].

Для забезпечення захисту від ультрафіолетового випромінювання одним із ефективних застосувань є екранування. Надійне екранування досягається цілісними екранами із матеріалів, підібраних індивідуально до параметрів зменшення дії опромінення. Сітчасті та не цілісні екрани є менш ефективними. Проте є випадки, коли застосування екранування не можливе, тоді має місце застосування екранованих ультрафіолетових бактерицидних ламп [36].

Обов'язковою умовою використання ультрафіолетових бактерицидних опромінювачів порід із забезпеченням належних умов знезараження повітря закритих приміщень є виключення можливості шкідливого впливу на людину надлишкового опромінення, надмірної концентрації парів азоту та ртуті [36].

Захист від інтенсивного опромінення досягається такими простими методами як раціональним розташуванням робочих місць, захистом відстанню, екрануванням джерел випромінювання та робочих місць, засобами індивідуального захисту. Обладнуючи приміщення, де буде знаходитися ультрафіолетова бактерицидна лампа, треба враховувати, відображувану здатність різних оздоблювальних матеріалів для ультрафіолетового опромінення інша, ніж для видимого світла. Так, наприклад, добре відображають ультрафіолет полірований алюміній і побілка, в той час погано — фарби на масляній основі, оксиди цинку та титана [36].

Бактерицидна опроміненість в місцях перебування людей та на робочих місцях не повинна перевищувати $0,2 \text{ мкВт/см}^2$ при довжині хвилі опромінення 254 нм. Також слід враховувати, що при збільшенні відносної вологості до 80% бактерицидна дія падає на 30% через ефект екранування мікроорганізмів [35].

Час можливого безпечного перебування людини в приміщенні, в якому працює екранована ультрафіолетова бактерицидна лампа при значенні щільності бактерицидного потоку випромінювання більше $0,2 \text{ мкВт/см}^2$, обчислюється за формулою (4.1):

$$t \text{ с} = \frac{6000}{p}, \quad (4.1)$$

де t (с) — час безпечного перебування людини в приміщенні, с; 6000 — поверхнева доза (мкДж/см^2) бактерицидного опромінення при вимірюванні УФ-опромінення з довжиною хвилі 254 нм, яку безпечно для здоров'я може отримати людина за кожні 8 годин безперервного перебування в приміщенні, в якому працює ультрафіолетова бактерицидна лампа; p — бактерицидна опроміненість (поверхнева щільність бактерицидного потоку випромінювання при вимірюванні УФ-опромінення з довжиною хвилі 254 нм), що виміряна за допомогою ультрафіолетового радіометру в конкретній точці приміщення, для якої розраховується час безпечного перебування людини, мкВт/см^2 [35].

Розраховуємо час можливого безпечного перебування людини в приміщенні з ультрафіолетовою лампою з бактерицидною щільністю $0,61 \text{ мкВт/см}^2$:

$$6000/0,61 = 9836 \text{ с.}$$

Час перебування працівників у виробничій лабораторії з увімкненою лампою ультрафіолетового випромінювання без шкоди для здоров'я становить 9836 с або 163,93 хв.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів

Пожежну безпеку об'єкта повинні забезпечувати системами запобігання пожеж та протипожежного захисту, в тому числі організаційно-технічними заходами.

Основними причинами виникнення пожеж на підприємствах є:

- недбале поводження з відкритим вогнем при електро-, газозварювальних роботах, при роботі з паяльними лампами та іншими джерелами відкритого вогню;
- несправність опалювальних систем, підігрівання масла, відстійників і порушення правил їх експлуатації;
- несправність перевантаження або неправильний монтаж електроустановок і мереж, що призводить до підвищеного нагрівання або короткого замикання, іскріння;
- несправність обладнання, порушення технології заправлення транспорту;
- самозагорання горючих речовин при неправильному зберіганні або через незнання їхньої пожежної небезпеки;
- розряди статичної і атмосферної електрики у разі неправильного виконання заземлень і блискавковідводів;
- куріння в пожежонебезпечних зонах [32].

Шкідливими факторами, що діють на людей та матеріальні цінності, є: полум'я й іскри, підвищена температура оточуючого середовища, токсичні продукти горіння і термічного розкладу, дим, знижена концентрація кисню. До другорядних проявів шкідливих факторів пожежі, що діють на людей та матеріальні цінності, відносяться: уламки, частини зруйнованих апаратів, агрегатів, установок, конструкцій; радіоактивні та токсичні речовини і матеріали, що вийшли зі зруйнованих апаратів та установок; електричний струм, що виник в результаті виносу високої напруги на струмопровідні частини конструкцій, апаратів, агрегатів; вогнегасні речовини [38].

Джерелами пожежі у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів можуть бути:

- відкрите полум'я;

- перегрів електричного обладнання;
- несправне електроустаткування, несправності в електропроводці, електричних розетках та вимикачах;
- перевантаження освітлювальних та силових мереж;
- несправні електроприлади;
- коротке замикання;
- невиконання вимог нормативних документів з питань пожежної безпеки та паління в недозволених місцях [39].

До причин вибуху у виробничій лабораторії можна віднести наявність в приміщенні ємності з легкозаймистими розчинниками, несправне обладнання, ємності з горючими рідинами. Небезпечними та шкідливими факторами, що діють на робочих в результаті вибуху, є: ударна хвиля, у фронті якої тиск перевищує допустиме значення; полум'я; конструкції, обладнання, комунікації, будівлі та споруди, що обрушуються, та їх частини, які розлітаються; утворені при вибуху та (або) виділені з пошкодженого обладнання шкідливі речовини, вміст яких в повітрі робочої зони перевищує гранично допустимі концентрації [41].

На випадок пожежі в лабораторії повинні бути:

- вогнегасник;
- листовий азбест або азбестова тканина; відро з дрібним піском;
- пожежний рукав;
- чотирихлористий вуглець.

На підприємстві пожежна безпека забезпечується за рахунок пожежної профілактики, заходів з попередження можливості виникнення пожежі й організації пожежогасіння, тобто найшвидшої ліквідації, що виникла [40].

Попередження пожежі на підприємствах досягається запобіганням утворенню горючого середовища та запобіганням появи в горючому середовищі джерел запалювання. Для попередження вибуху потрібно виключити утворення вибухонебезпечного середовища та виникнення джерела ініціювання вибуху [41].

Для забезпечення пожежо- та вибухобезпеки передбачені профілактичні огляди та плановий та капітальний ремонт технологічного обладнання. Вони повинні здійснюватися в терміни, передбачені проектом, технологічним регламентом, технічними умовами [33].

У разі виявлення ознак пожежі (горіння) в лабораторії та на підприємстві оголошують пожежну тривогу, включають сигнал загальної евакуації. Негайно повідомляють пожежно-рятувальний підрозділ та керівника чи відповідну компетентну посадову особу. За можливості потрібно вжити заходи щодо евакуювання людей, гасіння пожежі первинними засобами пожежогасіння та збереження матеріальних цінностей [40].

Потрібно здійснити відключення від енергопостачання обладнання з дотриманням техніки безпеки. Для гасіння пожежі використовують наявні засоби для гасіння пожежі (вогнегасник, простирадло, пісок та інше). Спосіб гасіння пожежі залежить як від причин, так і від характеру палаючого об'єкту [40].

З прибуттям на пожежу пожежно-рятувальних підрозділів повинен бути забезпечений безперешкодний доступ їх на територію об'єкта, за винятком випадків, коли чинним законодавством встановлений особливий порядок допуску [47].

4.4. Висновки до розділу

Небезпечними та шкідливими виробничими факторами у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів є понижена або підвищена температура обладнання та матеріалів, мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності; хімічний фактор, понижена рухомість повітря, недостатня освітленість робочої зони та підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Для захисту персоналу від них застосовують різні колективні та індивідуальні засоби захисту. Розраховано, що час можливого безпечного перебування людини в приміщенні з ультрафіолетовою лампою з бактерицидною щільністю $0,61 \text{ мкВт/см}^2$ становить 163,93 хвилини. На випадок пожежі та (або) вибуху мають передбачатись профілактичні огляди, ремонт обладнання, засоби

пожежогасіння, план евакуації персоналу, різні інструкції поводження персоналу під час пожежі і вибуху, сигналізація.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Відходи виробництва пробіотичних препаратів

При виробництві пробіотичних препаратів утворюються рідкі, тверді та газоподібні відходи. Вони забруднюють гідросферу, атмосферу, ґрунти та впливають на життєдіяльність людини.

Відходами виробництва пробіотичних препаратів є вичавки кореня цикорію, папір, картон, пластмаса [49].

Відходи поділяють на небезпечні та безпечні. Небезпечні відходи — це небезпечні хімічні речовини, небезпечні радіоактивні, вогнебезпечні, вибухонебезпечні речовини тощо. Вони підлягають спеціальному обробленню і знешкодженню. Безпечні відходи підлягають обробленню з метою отримання корисного продукту. Для з'ясування особливостей подальшого оброблення твердих відходів: організації звалища відходів, утворення гумусу або навіть використання відходів з метою отримання енергії — необхідно визначити деякі фізичні та хімічні характеристики відходів. Якщо відходи планують використовувати як паливо, найважливішими є такі три характеристики: безпосередній аналіз, граничний аналіз і вміст енергії (тепла) [49].

Безпосередній аналіз визначає відсоток:

- вологості;
- летких речовин, які спричиняють додаткові втрати маси під час спалювання за 905 °С;
- золи (залишків після спалювання);
- залишків зв'язаного вуглецю;
- негорючих речовин [50].

За допомогою граничного аналізу визначають відсоток вуглецю, водню, кисню, азоту, сірки, золи. Вміст енергії (тепла) відходів наведено в таблиці 5.1, в якій також показано діапазон і типові значення вмісту компонентів у відходах [49].

Таблиця 5.1

Безпосередній і граничний хімічний аналіз муніципальних твердих відходів

Фізико-хімічні характеристики відходів	Відсоток маси	
	Діапазон	Типове значення
Безпосередній аналіз		
Вологість	15-40	20
Леткі речовини	40-60	53
Зв'язаний вуглець	5-12	7
Негорючі речовини	15-30	20
Граничний аналіз (горючі компоненти)		
Вуглець	40-60	47,0
Водень	4-8	6,0
Кисень	30-50	40
Азот	0,2-1,0	0,8
Сірка	0,05-0,3	0,2
Зола	1-10	6,0
Теплові значення		
Органічні фракції, кДж/кг	12 000-16 000	14 000
Разом, кДж/кг	8000-12 000	10 500

Насамперед перед прийняттям рішень щодо використання відходів необхідно ідентифікувати поелементний склад відходів, розмір часток, вміст вологи та густину твердих відходів [49].

5.1.1. Вологість

Вологість залежить від втрати маси завдяки вилученню вологи під час висушування, яке здійснюють протягом 1 год за температури 105 °С [50].

Вміст вологи у твердих відходах — це маса вологи на одиницю маси мокрого або сухого матеріалу. У методі вимірювання мокрої маси вологість зразка виражають у відсотках мокрої маси матеріалу; у методі сухої маси — у відсотках сухої маси матеріалу. Вміст вологи в мокрій масі обчислюють за формулою 5.1 [50].

$$\text{Вміст вологи} = \frac{a-b}{a} \cdot 100, \quad (5.1)$$

де a — початкова маса зразка; b — маса зразка після висушування.

Щоб одержати суху масу, тверді відходи висушують у печі за температури 77 °С протягом 24 год. Ця температура і час необхідні для повної дегідратації (висушування) матеріалу та обмеження летких матеріалів. З таблиці про типові дані про вміст вологи для твердих відходів взято значення вологості для органічних продуктів, а саме: діапазон 10-60%, типове значення 25% [50].

5.1.2. Густина

Типова густина для органічних відходів, які містяться в контейнерах, лежить в діапазоні 90-360 кг/м³, типове значення становить 240 кг/м³. Через те, що густина твердих відходів змінюється відповідно до географічного місцезнаходження, пори року і протягом часу зберігання, необхідно дуже уважно ставитися до вибору типових значень [50].

5.1.3. Вміст енергії

Інформація про хімічний склад твердих відходів є дуже важливою для оцінювання альтернативних варіантів оброблення і відновлення енергії. Інертний залишок різноманітних органічних речовин лежить в діапазоні 2-8%, типове

значення 6%, а вміст енергії в них лежить в діапазоні 11 100-26 000 кДж/кг, типове значення 18 000 кДж/кг. Значення енергії можуть бути перетворені в значення сухої основи (a dry basis) за допомогою рівняння (5.2) [49]:

$$\frac{\text{кДж}}{\text{кг}} \text{ суха основа} = \text{кДж/кг} \cdot \frac{100}{100 - \% \text{ вологи}}. \quad (5.2)$$

Рівняння для сухої основи без золи:

$$\frac{\text{кДж}}{\text{кг}} \text{ суха основа без золи} = \text{кДж/кг} \cdot \frac{100}{100 - \% \text{ золи} - \% \text{ вологи}}. \quad (5.3)$$

5.1.4. Хімічний склад

Типові дані відсотку маси (сухої основи) граничного (кінцевого) аналізу різних органічних речовин: вуглець — 48,5%, водень — 6,5%, кисень — 37,5%, азот — 2,2%, сірка — 0,3%, зола — 5,0%. Якщо значення енергії розрахувати неможливо, наближені значення можна обчислити за допомогою рівняння (5.4), відомого, як змінена формула Дюлонга [49]:

$$\frac{\text{кДж}}{\text{кг}} = 337 C + 1428 H - \frac{O}{8} + 9S, \quad (5.4)$$

де C — вуглець, %; H — водень, %; O — кисень, %; S — сірка, %.

5.1.5. Перероблення відходів

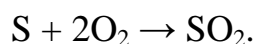
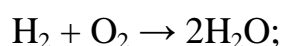
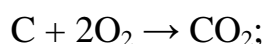
Продукти біологічного перероблення, які можна отримати з твердих відходів, містять метан, компост, різноманітні спирти, протеїни та інші органічні сполуки. Процеси, які застосовують з цією метою, наведено в таблиці 5.2 [49].

Біологічні процеси відновлення продуктів перероблення з твердих відходів

Процес	Продукт перероблення	Підготовчий процес
Аеробне перероблення	Компост	Сепарація органічних фракцій, подрібнення (зменшення розміру часток)
Лужний гідроліз	Органічні кислоти	Сепарація органічних фракцій, подрібнення
Аеробне бродіння (на звалищі)	Метан	Ніяких процесів, крім розміщення в контейнерних відсіках
Аеробне бродіння	Метан	Сепарація органічних фракцій, подрібнення
Ферментація (після кислотного гідролізу)	Етанол, протеїн	Сепарація органічних фракцій, подрібнення, кислотний гідроліз для утворення глюкози

5.1.6. Спалювання відходів

Для повного спалювання відходів необхідно забезпечити потрібну кількість кисню, що вступає в реакцію з вуглецем, воднем і сіркою [50]:

**5.1.7. Оцінювання економічних збитків від забруднення навколишнього середовища твердими відходами**

Якщо тверді відходи не утилізуються, то їх знищують або накопичують на звалищах та в шламозбірниках. Процеси, які відбуваються під час цих операцій, призводять до вторинного забруднення повітря, водоймищ, ґрунту та підземних вод. Економічні збитки при цьому необхідно розраховувати за всіма реципієнтами (об'єктами), на які впливає забруднення [49].

Економічні збитки обчислюють за формулою:

$$Z_{\text{відх}} = V_{\text{відх}} + Z_{\text{тер}} + Z_{\text{атм}}^{\text{втор}} + Z_{\text{вод}}^{\text{втор}},$$

де $Z_{\text{відх}}$ — загальні збитки від вивезення та розташування відходів на відкритому майданчику, грн; $V_{\text{відх}}$ — витрати на вивезення, завантаження та розвантаження, поховання та знищення відходів, грн; $Z_{\text{тер}}$ — розмір збитків від вилучення території під складування, утворення відвалів, поховання з подальшою санітарно-гігієнічною рекультивацією ґрунту, грн; $Z_{\text{атм}}^{\text{втор}}$, $Z_{\text{вод}}^{\text{втор}}$ — збитки від вторинного забруднення повітря та водних об'єктів, грн. [49]

Витрати на відходи розраховують за формулою (5.5):

$$V_{\text{відх}} = V_{\text{т}} + V_{\text{утр}} + E_{\text{т}} \cdot K_{\text{с}} A_{\text{відх}}, \quad (5.5)$$

де $V_{\text{т}}$ — витрати на видалення (транспортування, завантаження, розвантаження) відходів, грн/т (табл. 5.3); $V_{\text{утр}}$ — експлуатаційні витрати, пов'язані з обслуговуванням звалища, знезараженням відходів, грн/т (у місті Київ становлять 0,750 грн/т); $E_{\text{к}}$ — нормативний коефіцієнт ефективності капітальних вкладень, беруть $E_{\text{к}} = 0,16$ рік⁻¹; $K_{\text{с}}$ — питомі капітальні витрати на будівництво систем видалення, знешкодження (знищення) відходів у спеціальних спорудах, грн/т (табл. 5.4); $A_{\text{відх}}$ — кількість відходів, т/рік. [49]

Таблиця 5.3

Поточні витрати на видалення відходів

Відстань перевезень, км	До 24	30	40	50	60	70	80	90	100
$V_{\text{т}}$, грн/т	7,0	7,24	7,58	7,88	8,18	8,48	8,78	9,08	9,38

Примітка: з урахуванням витрат на навантажувальні та розвантажувальні роботи, які становлять 5,68 грн/т.

$$Z_{\text{тер}} = V_{\text{зем}} + V_{\text{рек.з}} S A_{\text{відх}},$$

де $V_{\text{зем}}$ — економічна оцінка 1 га землі нормативом витрат на відшкодування збитків сільськогосподарського виробництва, грн/га; $V_{\text{рек.з}}$ — витрати на санітарно-гігієнічну рекуперацію землі, грн/га; S — площа, яка використовується для

складання відходів, беруть за галузевими нормативами в середньому від 0,0002 до 0,00002 га за 1 т відходів (табл. 5.4) [49].

Таблиця 5.4

Приблизні питомі експлуатаційні та капітальні витрати на знешкодження, складання та знищення твердих відходів

Основні показники	Висота складеного шару відходів з урахуванням повного ущільнення за весь термін експлуатації полігона		
	4,0	10,0	25,0
Середнє навантаження на зайняту площу, т/м ²	2,0-2,5	4,0-6,0	10,0-12,0
Питомі капітальні вкладення:			
– на одиницю маси відходів, які складаються К _с , грн/т	0,5-1,0	0,3-0,5	0,15-0,25
– на одиницю зайнятої під відходи площі, грн/га	20-40	20-40	20-40
– на одиницю об'єму відходів, грн/м ³	0,25-0,5	0,15-0,25	
Питомі експлуатаційні витрати, V _{втр} , грн/т	0,6-0,7	0,5-0,6	0,08-0,12
Питома площа землі, га/т відходів		0,0002-0,00002	0,4-0,5

Якщо взяти вартість 1 га землі V_{зем} в умовах України за 24500 грн, а витрати на рекуперацію V_{рек.з} = 2618 грн/га, то отримаємо формулу [49]:

$$Z_{\text{тер}} = 27118SA_{\text{відх}}.$$

Збитки від вторинного забруднення атмосфери і водоймищ визначають за формулами:

$$Z_{\text{атм}}^{\text{втор}} = 12\sigma_{\text{заз}}^{\text{атм}} f A_i N_i^{\text{атм}} A_{\text{відх}};$$

$$Z_{\text{вод}}^{\text{втор}} = 144\sigma_{\text{к}}^{\text{вод}} N_j^{\text{вод}} A_{\text{відх}},$$

де $\sigma_{\text{заз}}^{\text{атм}}$, $\sigma_{\text{к}}^{\text{вод}}$ — показники відносної небезпеки забруднення відповідно атмосфери та водоймища (для Дніпра м. Київ $\sigma_{\text{к}}^{\text{вод}} = 1,75$); $H_i^{\text{атм}}$, $H_j^{\text{вод}}$ — кількість забруднюючих речовин, яка потрапляє в атмосферу чи водоймище від 1 т відходів [49].

Іноді використовують спрощену формулу (5.6) для розрахунку економічного збитку від забруднення навколишнього середовища відходами та вилучення земельних ресурсів із сільськогосподарського використання [49]:

$$Z_{\text{відх}} = qZ_{\text{гр}}M, \quad (5.6)$$

де q — показник відносної цінності ресурсів (для районів Полісся $q=0,5$); $Z_{\text{гр}}$ — питомі збитки від скидання шкідливих речовин у ґрунт (для органічних речовин $Z_{\text{гр}} = 3$ грн/т); M — маса шкідливих відходів, т/рік [49].

5.2. Розрахунок вартості утилізації відходів виробництва пробіотичних препаратів

В розрахунках брались до уваги такі відходи, як картон, папір, пластмаса, біомаса.

Розрахуємо *вміст вологи* в відходах. Суха маса (на основі 100 кг відходів) становить $42,3 + 9,5 + 9,8 + 4 = 65,6$ кг. Обраховуємо вміст вологи:

$$\text{Вміст вологи} = ((100 - 65,6) / 100) \cdot 100 = 34,4\%.$$

Об'єм відходів складає $5,29 + 2 + 1,54 + 0,95 = 9,78$ м³. Тоді обчислимо *густину зразка відходів* (100 кг) [49]:

$$\text{Густина} = 100 / 9,78 = 10,22 \text{ кг/м}^3.$$

Загальна енергія цих відходів становить $753\,750 + 163\,000 + 326\,000 + 65\,000 = 1\,307\,750$ кДж. Розрахуємо *вміст енергії*:

$$\text{Вміст енергії} = 1\,307\,750 / 100 = 13\,077,5 \text{ кДж/кг}$$

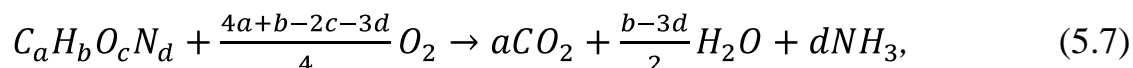
Визначаємо *вміст енергії на сухій основі*:

$$\text{кДж/кг (суха основа)} = 13\,077,5(100 / (100-34,4)) = 19\,935.$$

Визначаємо *вміст енергії на сухій основі, вільній від золи* (припустимо, що вміст золи становить 5%) [50]:

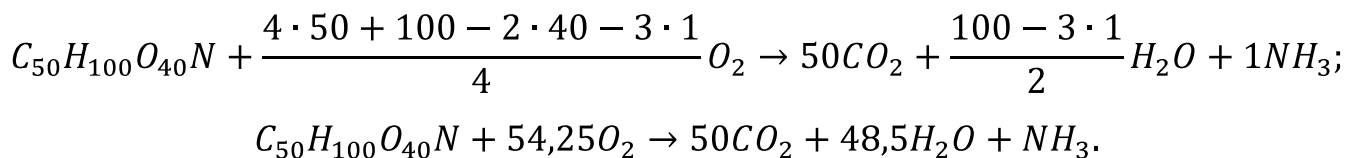
$$\text{кДж/кг (суха основа без золи)} = 13\,077,5(100 / (100 - 5 - 34,4)) = 21\,580.$$

Перероблення відходів. Визначимо кількість кисню, необхідного для повної оксидатації 1 т відходів з хімічною формулою $C_{50}H_{100}O_{40}N$. Кількість кисню, необхідного для повної аеробної стабілізації твердих відходів, обчислюють за формулою [49]:



де a, b, c, d — кількість атомів відповідно С, Н, О, N у хімічній формулі.

Складаємо хімічну формулу для розрахунку кількості кисню, необхідного для перероблення відходів [49]:



Обчислюємо мольні маси:

$$(50 \cdot 12 + 1 \cdot 100 + 16 \cdot 40 + 1 \cdot 14) + 54,25 \cdot 16 = 50(12 + 2 \cdot 16) + 48,5(2 \cdot 1 + 16) + (14 + 3 \cdot 1);$$

$$1354 + 1736 = 2200 + 873 + 17.$$

Кількість кисню, потрібного для реакції стабілізації аміаку під час перероблення 1000 кг відходів [49]:

$$O_2 = 17 : 1354 \cdot 64 : 17 \cdot 1000 = 47,3 \text{ кг.}$$

Загальна кількість кисню, потрібного для перероблення 1000 кг відходів:

$$O_2 = 1282 + 47,3 = 1329 \text{ кг.}$$

Загальна кількість повітря, необхідного для перероблення 1000 кг відходів, враховуючи, що вміст кисню становить 23,15%:

$$1329 : 0,2315 = 5742 \text{ кг.}$$

Загальний об'єм повітря, необхідного для перероблення 1000 кг відходів, враховуючи, що густина повітря становить 1,2928 кг/м³ [49]:

$$5742 : 1,2928 = 4442 \text{ м}^3.$$

Спалювання відходів. Визначимо кількість кисню, необхідного для повного спалювання 1 т відходів. Мольна маса відходів дорівнює 1354. Відсотковий вміст у

відходах вуглецю 44,3%, водню — 7,4%, кисню — 47,3 %, азоту — 1%.
Обчислюємо кількість чистого водню: $7,4 - 47,3 : 8 = 1,49$ % [49].

Обчислюємо кількість повітря для спалювання 1000 кг відходів відповідно до вимог для спалювання вуглецю (11,52 кг/кг) і водню (34,56 кг/кг):

Повітря для вуглецю = $0,443 \cdot 1000 \cdot 11,52 = 5103$ кг.

Повітря для водню = $0,0149 \cdot 1000 \cdot 34,56 = 515$ кг.

Всього необхідно повітря для спалювання 5618 кг.

Оцінка економічних збитків від забруднення навколишнього середовища твердими відходами. Обчислюємо питомі витрати на перевезення і поховання відходів:

$$V_{\text{відх}} = 7 + (0,750 + 0,16 \cdot 1) \cdot 1,05 = 7,95 \text{ грн/т.}$$

Розраховуємо питомі витрати на рекультивацію земель:

$$Z_{\text{відх}} = 0,5 \cdot 3 \cdot 650000 = 975\,000 \text{ грн/рік.}$$

5.3. Висновки до розділу

При виробництві пробіотичного препарату утворюються такі відходи, як вичавки кореня цикорію, папір, картон, пластмаса, які негативно впливають на навколишнє середовище. Тому вони мають підлягати переробці.

З цією метою було розраховано вологість, густину, вміст енергії відходів. Загальний об'єм повітря, необхідний для перероблення 1 т даних відходів становить 4442 м³. Для спалювання 1 т даних відходів потрібно всього повітря 5618 кг. Питомі витрати на перевезення і поховання відходів становлять 7,95 грн/т. Питомі витрати на рекультивацію земель складають 975000 грн/рік.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що пробіотики — це живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які за природного способу введення зумовлюють позитивні ефекти на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму людини чи тварини внаслідок оптимізації та стабілізації його мікробіоти. Їх випускають в рідкій і сухій формах. Ліофілізовані форми мають пройти процес реактивації. Вітчизняному виробнику пробіотиків належить 17 % ринку, який представлений ліофілізованими монопрепаратами. Препарати закордонного виробництва становлять понад 80 %, з яких більшість належить до класу симбіотиків. Ліпогрейд відноситься до дієтичних добавок, що сприяють нормалізації ліпідного обміну. Діючими її речовинами є жива активна культура *L. plantarum* (не менше $2 \cdot 10^9$ КУО) та полікозанол.

2. Було з'ясовано, що у коренеплодах цикорію міститься 16–24 % інуліну та 2,5 % фруктового цукру. Тому було прийнято рішення дослідити цикорій в якості джерела вуглецю у поживних середовищах капустяному та MRS без глюкози. Розглянуто такі методики проведення експериментів, як отримання накопичувальної і чистої культур, визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacillus*, мікроскопію лактобацил, відновлення нітратів в нітрити, утворення аміаку з аргініну, каталазної та протеолітичної активностей, активності кислотоутворення, визначення росту молочнокислих бактерій при різних температурах та визначення біомаси ваговим методом.

3. Доведено, що при культивуванні *L. plantarum* на поживному середовищі з цикорієм вміст сухої біомаси майже на 5% більший порівняно з контролем, а кислотність більша на 14% в порівнянні з контролем. Заміна глюкози на цикорій в поживному середовищі покращує протеолітичну активність на 13% та не впливає негативно на такі показники, як каталазна активність, відновлення нітратів в нітрити, утворення аміаку з аргініну. Тому використання цикорію в якості джерела вуглецю можливе.

4. Досліджено, що небезпечними та шкідливими виробничими факторами у виробничій лабораторії заводу з виробництва пробіотичних препаратів є понижена або підвищена температура обладнання та матеріалів, мікроорганізми та продукти їх життєдіяльності; хімічний фактор, понижена рухомість повітря, недостатня освітленість робочої зони та підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Для захисту персоналу від них застосовують різні колективні та індивідуальні засоби захисту. Час можливого безпечного перебування людини в приміщенні з ультрафіолетовою лампою з бактерицидною щільністю $0,61 \text{ мкВт/см}^2$ становить 163,93 хвилини. На випадок пожежі та (або) вибуху мають передбачатись профілактичні огляди, ремонт обладнання, засоби пожежогасіння, план евакуації персоналу, різні інструкції поведження персоналу під час пожежі і вибуху, сигналізація.

5. При виробництві пробіотичного препарату утворюються такі відходи, як вичавки кореня цикорію, папір, картон, пластмаса, які негативно впливають на навколишнє середовище. Загальний об'єм повітря, необхідний для перероблення 1 т даних відходів становить 4442 м^3 . Для спалювання 1 т даних відходів потрібно всього повітря 5618 кг. Питомі витрати на перевезення і поховання відходів становлять 7,95 грн/т. Питомі витрати на рекультивацию земель складають 975000 грн/рік.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Тимченко Л.Д. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капустная среда для культивирования лактобактерий / Л.Д. Тимченко, Н.И. Пенькова, Л.С. Катутина // Вестник МГОУ. Сер. Естественные науки. – 2010. – № 2. – 152 с.
2. Зикова Н.С. Біотехнологія селенвмісних пробіотиків : дис. канд. техн. наук : 03.00.20 / Н.С. Зикова. – Одеса, 2017. – 328 с.
3. Цинберг М.Б. Ростовые и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой сред / М.Б. Цинберг, Д.Г. Дерябин, И.В. Денисова и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – 48, № 12. – 9-13 с.
4. Акулевич О.В. Кінетика росту молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* на живильних середовищах з різноманітними джерелами вуглецевого й азотного живлення / О.В. Акулевич, Л.Б. Орябінська, О.М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2013. – №3. – 7–11 с.
5. Старовойтова С.О. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – Київ: НУХТ, 2012. – 318 с.
6. Халіль А. Оптимізація процесів культивування у виробництві пробіотичних препаратів на основі лактобацил : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.20 "біотехнологія" / А. Халіль – Київ, 2004. – 26 с.
7. Мельничук М.Л. Загальна (промислова) біотехнологія: Навч. посіб. / М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко, В.В. Бородай, Ю.В. Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 252 с.
8. Ліпогрейд (Lipogreйд) - інструкція [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://biopharma.com.ua>.

9. Marinangeli C.P. Comparison of composition and absorption of sugarcane policosanols (abstract) / C.P. Marinangeli, A.N. Kassis, D. Jain et al. – 2007.
10. Сучасні аспекти збереження здоров'я людини: Збірник наукових праць ІХ Міжнародної міждисциплінарної наук.-практ. конф. / За ред. проф. Т.М. Ганича. – Ужгород: 2016. – 388 с.
11. Юнес Р.А. Адаптивное значение для человека бактерий рода *Lactobacillus* и рода *Bifidobacterium*: дис. канд. біол. наук : 03.02.08 / Р.А. Юнес. – Москва, 2016. – 154 с.
12. *Lactobacillus plantarum* [Електронний ресурс] // Функциональная гастроэнтерология – Режим доступа до ресурсу: <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/5612>.
13. Abdolhossien R.N. The effect of vehicle on physical properties and aerosolisation behaviour of disodium cromoglycate microparticles spray dried alone or with L-leucine / R.N. Abdolhossien, G. Kambiz, B. Mohahhadali et al. // Int. J. Pharm. — 2004. — № 285.
14. Lee J. Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion / J. Lee, S.J. Lee, J.Y. Choi et al. // Eur. J. Pharm. Sci. — 2005. — № 24.
15. Черных В.П. От субстанции к лекарству / Под ред. В.П. Черных. — Х., 2005.
16. The Merk index: An Encyclopedia of chemicals, drugs and biological / 13 Ed, 2001. — № 1.
17. Кнунянц И.Л. Химическая энциклопедия: В 5 т.: Т. 2 / И.Л. Кнунянц (гл. ред.) и др. — М., 1990.
18. Rowe R.C. Handbook of Pharmaceutical Excipients / Edit by R.C. Rowe, P.J. Shesky, S.C. Owen — London-Chicago, 2006.

19. Muzikova J. Effects of magnesium stearate on the tensile strength of tablets made with the binder Prosolv SMCC 90 / J. Muzikova // *Cesra Slow Farm*. — 2002. — № 51.

20. Жогло Ф. Допоміжні речовини та їх застосування в технології лікарських форм: Довідковий посібник / Ф. Жогло, В. Возняк, В. Попович, Я. Богдан. — Львів: Центр Європи 1996. — 92 с.

21. Перцев И.М. Фармацевтические и биологические аспекты масел: Монография / И.М. Перцев, А.М. Котенко, О.В. Чуешов, Е.Л. Халеева Е. — Х., 2003.

22. Hasegawa M. Direct compression: microcrystalline cellulose grade 12 versus classic grade 102 / M. Hasegawa // *Pharm. Technol.* — 2002. — № 26 (5).

23. Levis S.R. Production and evaluation of size-reduced grades of microcrystalline cellulose / S.R. Levis, P.B. Deasy // *Int. J. Pharm.* — 2001. — № 213.

24. Wu J.S. A statistical design to evaluate the influence of manufacturing factors on the material properties and functionalities of microcrystalline cellulose / J.S. Wu, H.O. Ho, M.T. Sheu // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2001. — № 12.

25. Шичева Л.А. Ботаническое описание цикория / Л.А. Шичева // *Цикорий*. — М.: ВНИИ сырья спиртовой промышленности, 1935. — 17–25 с.

26. Паншин Б.А. Биохимия цикория / Б.А. Паншин // *Цикорий*. — М.: ВНИИ сырья спиртовой промышленности, 1935. — 88, 91 с.

27. Вильчик В. А. Цикорий / А.А. Вильчик. — Ярославль: Верхне-волжское книжное издательство, 1982. — 11 с.

28. Волков Н.Н. Теоретические основы селекционной работы по выведению новых и улучшению старых сортов цикория / Н.Н. Волков // *Ученые записки МОПИ им. Крупской*. — М., 1960. — Т. 89, Вып. 2. — 23 с.

29. Степанов В.Н. Цикорий / В.Н. Степанов // *Растениеводство*. — М.: Россельхозиздат, 1959. — 167–168 с.

30. Яценко А.О. Цикорій: біологія, селекція, виробництво і переробка коренеплодів / А.О. Яценко. – Умань: 2003. – 157 с.

31. Миколайко В.П. Хімічний склад сортів та селекційних номерів цикорію коренеплідного селекції Уманської дослідно-селекційної станції Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків / В.П. Миколайко. // Селекція і насінництво. – 2015. – №107. – 115–121 с.

32. Борисюк В.О. Взаємозв'язок сухої речовини та інуліну в коренеплодах цикорію коренеплідного / В.О. Борисюк, К.А. Маковецький, А.О. Яценко // Цукрові буряки. – 2001. – № 3. – 8–9 с.

33. Яценко А.О. Цикорий корнеплодный / А.О. Яценко, А.В. Корниенко, Т.П. Жужжалова. – Воронеж: ВНИИСС, 2002. – 135 с.

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

35. Хижняк О.С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: дис. канд. фарм. наук : 15.00.01 / О.С. Хижняк. – Харків, 2016. – 167 с.

36. *Lactobacillus* MRS Agar (MRS Agar) (Granulated) [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://www.himedialabs.ru/gm641>.

37. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Т.П. Слюсаренко. – Москва: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. – 208 с.

38. Кравченко Н.О. Вплив пребіотиків на біологічну активність молочнокислих бактерій / Н.О. Кравченко, О.М. Дмитрук, Л.В. Божок та ін.]. // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2014. – №20. – 54–59 с.

39. Банникова Л.А. Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

40. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл / Н.А. Глушанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – №4. – 50–58 с.
41. Крупицька Л.О. Розробка технології синбіотичних біологічно активних добавок : дис. канд. техн. наук : 03.00.20 / Л.О. Крупицька. – Одеса, 2018. – 246 с.
42. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 384 с.
43. НАПБ А.01.001-2004 «Правила пожежної безпеки в Україні»: Нормативний акт з пожежної безпеки. – К.: Наказ Міністерства внутрішніх справ України. – 2004. – 86 с.
44. Основи охорони праці: підручник / [М. С. Одарченко, А. М. Одарченко, В. І. Степанов та ін.]. – Харків: Стиль-Издат, 2017. – 341 с.
45. Запорожець І.О. Основи охорони праці: підручник / О. І. Запорожець, О. С. Протоєрейський, Г. М. Франчук, І. М. Боровик. – К.: Центр учбової літератури, 2009. – 264 с.
46. Панфілов І. П. Електронні та квантові прилади НВЧ: Навч. посібник для вузів / І. П. Панфілов, Ю. В. Флейта. – Одеса: ОНАЗ ім. О. С. Попова, 2010. – 120 с.
47. Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях»: Санитарно - эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. – М.: Минздрав России. – 2005. – 48 с.
48. Беликов А. С. Безопасность жизнедеятельности. / А. С. Беликов, В. Ф. Залунин. – Дн – вск: Пороги, 1992. – 415 с.
49. Березюк О. В. Безпека життєдіяльності : навчальний посібник / О. В. Березюк, М. С. Лемешев. – Вінниця: ВНТУ, 2011. – 204 с.
50. ГОСТ 12.0.003-74 ССБТ. «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация»: Государственный стандарт. – М.: Госстандарт СССР. – 1974.– 5с.
51. ГОСТ 12.1.004-91 «Пожарная безопасность. Общие требования»: Государственный стандарт. – М.: Госстандарт СССР. – 1991.

52. ГОСТ 12.1.010-76 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Взрывобезопасность. Общие требования»: Государственный стандарт. – М.: Госстандарт СССР. – 1976. – 7 с.

53. ГОСТ 12.4.011-89 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Средства защиты работающих. Общие требования и классификация» : Государственный стандарт. – М.: Госстандарт СССР. – 1989. – 4 с.

54. ДБН В.2.5-28-2006 «Природне і штучне освітлення»: Державні будівельні норми України - К.: Мінбуд України. – 2006. – 96с.

55. ДБН В.2.5-67:2013 «Опалення, вентиляція та кондиціонування»: Державні Будівельні Норми. – К.: Інститут «УкрНДІспецбуд». – 2013. – 149 с.

56. ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень»: Державні Санітарні Правила і Норми. - К.: Міністерство охорони здоров'я. – 1999.– 10с.

57. ДСП 9.9.5.-080-02 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю»: Державні санітарні правила та норми,гігієнічні нормативи. – К.: Міністерство охорони здоров'я. – 2002. – 9с.

58. Жидецький В. Ц. Основи охорони праці / В. Ц. Жидецький, В. С. Джигирей, О. В. Мельников. – Львів: Афіша, 2000. – 348 с. – (Вид. 2-е, стеріотипне).

59. Карнаух Н.Н. Охрана труда: учебник для СПО / Н.Н. Карнаух. – М.: Юрайт, 2018. – 348 с.

60. Ісаєнко В.М. Екологія та охорона навколишнього середовища. Дипломне проектування: Навч. посіб. / В.М. Ісаєнко, В.М. Криворотько, Г.М. Франчук. – Київ: книжкове вид-во НАУ, 2005. – 192 с.

61. Сагайдак-Нікітюк Р.В. Логістика управління відходами фармацевтичної галузі: Моногр. / Р.В. Сагайдак-Нікітюк. — Х., 2010.

62. Відходи фармацевтичної продукції [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/7091/vidxodi-farmaceutichnoi-produkcii>.

63. Грицик В. Екологія довкілля. Охорона природи: навчальний посібник / В. Грицик, Ю. Канарський, Я. Бедрій. – К.: Кондор, 2009. – 292 с.

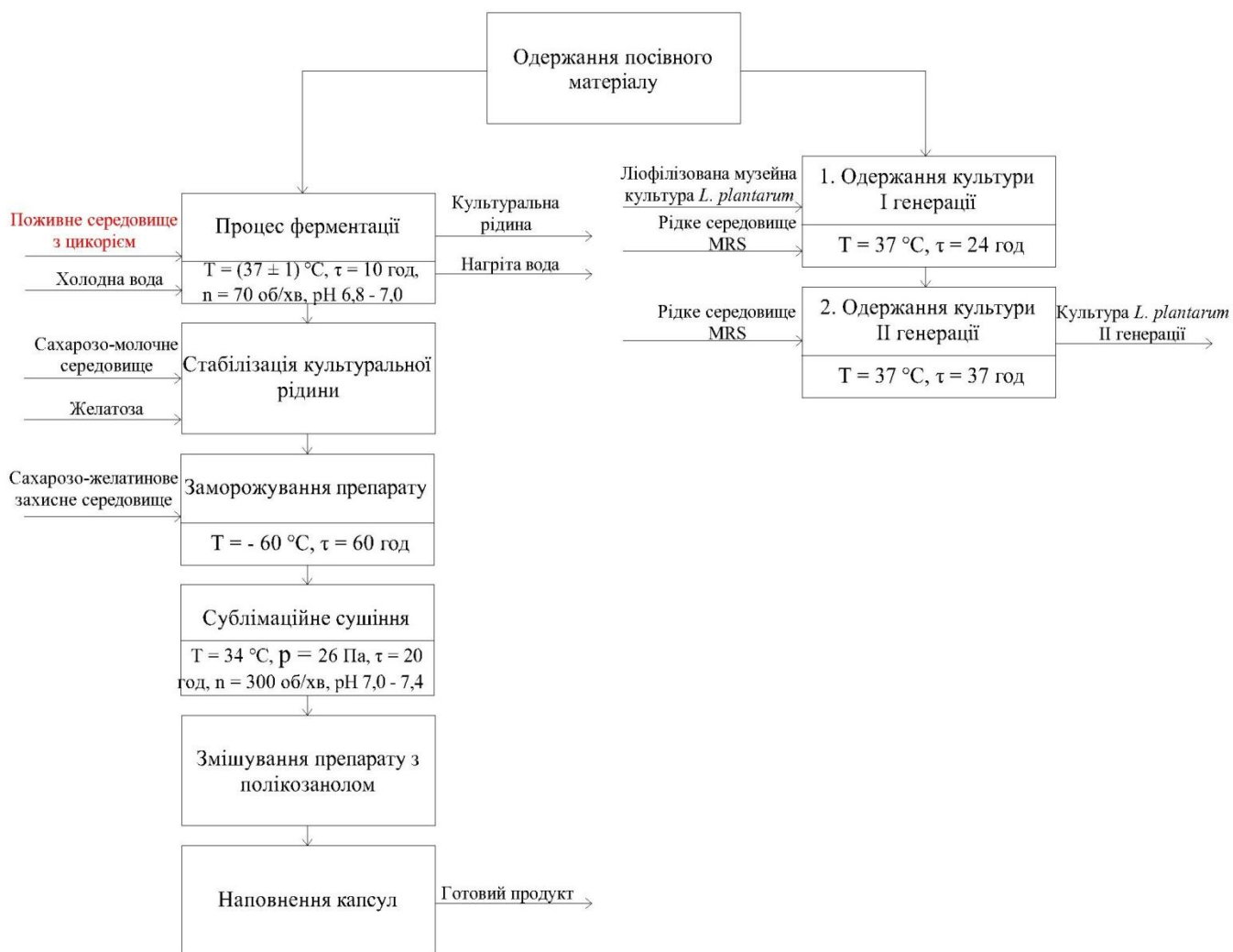


Рис. А.1. Технологічна схема виробництва дієтичної добавки «Ліпогрейд»