

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: «Вплив стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів»

Виконавець: студентка ФБ-205 М групи _____ Труш К. Б.
Керівник: к т. н., доцент кафедри біотехнології _____ Решетняк Л. Р.
Консультант розділу «Охорона праці»: _____ Павлиш В. Д.
Консультант розділу
«Охорона навколишнього середовища»: _____ Рябчевський О.В.
Нормоконтролер: _____ Дrajнікова А. В.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Барановський М.М. _____

«____» _____ 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Труш Катерини Борисівни

1. Тема дипломної роботи «Вплив стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів» затверджена наказом ректора від «15 вересня» 2020 р. №1657/ст.
2. Термін виконання роботи: з 05 жовтня 2020 року по 23 грудня 2020 року.
3. Вихідні дані роботи: літературні джерела щодо впливу стимуляторів росту на спороутворювальні бактерії *B. clausii*; пробіотики; мікроорганізм *B. clausii* – процес біосинтез, поживне середовище, пробіотик «Ентерожерміни».
4. Зміст пояснювальної записки: РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ НА ПРОЦЕС БІОСИНТЕЗУ КУЛЬТУРИ *B. CLAUSII* РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 8 таблиці, 22 рисунки.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис
1	Вибір теми дипломної роботи, узгодження змісту з дипломним керівником.	05.09.2020	
2	Пошук літературних джерел за темою дипломної роботи	05.09. 2020-20.09.2020	
3	Складання схеми виконання магістерської дипломної роботи.	21.09.2020-29.09.2020	
4	Проведення експерименту на базі проходження переддипломної практики	30.09.2020-02.09.2020	
5	Оформлення дипломної роботи та написання висновків	03.09.2020-07.09.2020	
6	Перевірка дипломної роботи керівником.	08.12.2020-09.12.2020	
7	Попередній захист дипломної роботи	10.12.2020	
8	Захист дипломної роботи.	23.12.2020	

7. Консультанти з окремих розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис та дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Старший викладач Павлиш В. Д.		
Охорона навколишнього середовища	Рябчевський О.В.		

8. Дата видачі завдання: « ____ » _____ 20 __ р.

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

Завдання прийнято до виконання: _____ Труш К. Б.
(підпис

керівника)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи « Вплив стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів» 92 сторінок, 22 рисунка, 8 таблиць, 67 використаних джерел.

Мета роботи: вплив стимуляторів росту на біосинтез спороутворювальних бактерій *B. clausii*.

Об'єкт дослідження: біосинтез спороутворювальних бактерій *B. clausii*.

Предмет дослідження: спороутворювальні бактерії *B. clausii*.

Методи дослідження: біологічні, мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні.

Наведено класифікацію та описано функції біологічно активних речовин. До біологічно активних речовин також відносять пробіотики. Наведено перелік мікроорганізмів здатних продукувати пробіотики, їх класифікують на 4 групи: аероби – спороутворювальні бактерії роду *Bacillus*; анаероби – спороутворюючі бактерії роду *Clostridium*; бактерії, які продукують молочну кислоту (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*); дріжджі – використовуються в якості сировини при виготовленні прибутків.

B. clausii потрапивши в шлунок здатні синтезувати амілази та ліпази. *B. clausii*, що знаходяться в складі «Ентерожерміни», синтезують велику кількість вітаміну В₂. *B. clausii* володіють широким спектром резистентності до антибіотиків, які використовують для лікування: цефалоспорини, аміноглікозиди, канаміцин, тобраміцин, амікацин, макроліди, тетрациклін, рефампіцин.

Матеріали дипломної роботи можуть бути використані при викладанні дисциплін за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія».

ФАКТОРИ РОСТУ, ПРОБІОТИКИ, БІОСИНТЕЗ, БАКТЕРІЇ *BACILLUS CLAUSII*, СПОРОУТВОРЮВАЛЬНІ, АМІНОКИСЛОТИ

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	11
1.1. Класифікація та функції біологічно активних речовин	11
1.2. Сучасні уявлення щодо пробіотиків.....	15
1.3. Фармакологічна дія пробіотиків.....	19
1.4. Теоретичні основи біосинтезу біологічно активних речовин	22
1.4.1. Хімічний метод синтезу біологічно активних речовин.....	23
1.4.2. Мікробіологічний метод синтезу біологічно активних речовин.....	26
1.5. Стимулятори росту та їх вплив на біосинтез мікроорганізмів.....	30
1.6. Висновки до розділу.....	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	34
2.1. Об'єкти дослідження.....	34
2.1.1. Характеристика лікарського препарату «Ентерожерміна».....	34
2.1.2. Властивості спороутворювальних бактерій <i>B. clausii</i>	36
2.1.3. Склад поживних середовищ для культивування	37
2.1.4. Основне обладнання для біосинтезу мікроорганізмів <i>B. clausii</i>	40
2.2. Методи дослідження	44
2.2.1. Методи виділення чистої культури <i>B. clausii</i>	44
2.2.2. Методи культивування бактерії <i>B. clausii</i>	46
2.2.3. Методи визначення біомаси культури <i>B. clausii</i>	49
2.2.4. Визначення критеріїв оцінки процесу біосинтезу культури <i>B. clausii</i>	50
2.2.5. Методи кількісного підрахунку бактерій <i>B. clausii</i>	52
2.3. Висновки до розділу.....	54
РОЗДІЛ 3. ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ НА ПРОЦЕС БІОСИНТЕЗУ КУЛЬТУРИ <i>B. CLAUSII</i>	55
3.1. Виділення чистої культури <i>B. clausii</i>	55

3.2. Морфолого-культуральні ознаки виділеної культури <i>B. clausii</i>	58
3.3. Процес біосинтезу бактерії <i>B. clausii</i>	60
3.4. Кількісний підрахунок бактерій <i>B. clausii</i>	63
3.5. Вплив стимуляторів росту на процес накопичення культури <i>B. clausii</i>	64
3.6. Технологічна схема одержання пробіотика «Ентерожерміна»	68
3.7. Висновки до розділу.....	69
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	70
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні впливу стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у .. виробництві лікарських засобів	70
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні впливу стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів.	71
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки під час при дослідженні вплив стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів	75
4.4. Висновки до розділу	78
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	79
5.1. Небезпека для довкілля технології виготовлення лікарських засобів.....	79
5.2. Викиди в атмосферу.....	79
5.3. Стічні води	82
5.4. Тверді і небезпечні відходи.....	83
5.5. Висновки до розділу.....	85
ВИСНОВКИ	86
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	87

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

БАР	– біологічно активні речовини
ГР	– групи речовин
ГФ	– газова фаза
ГРФ	– газова і рідка фаза
КУО	– колонієутворюючі одиниці
ЛЗР	– легкозаймісті речовини
ЛОС	– леткі органічні сполуки
МПА	– м'ясо-пептонний агар
РФ	– рідка фаза

ВСТУП

Актуальність теми. Організація будь-якого мікробіологічного синтезу практично важливих речовин починається з вивчення фізіології продуцента. Необхідно вивчити характер живлення продуцента, а також вплив зовнішніх факторів на стан клітин і популяцій. Ці питання з'ясовуються шляхом оптимізації досліджуваного процесу. Основою для цього є культивування мікроорганізмів в контрольованих і керованих умовах. Зрештою встановлюють склад середовищ і режим культивування, найбільш прийнятні економічно, які надалі емпірично можливо вдосконалювати при веденні процесу в промисловому масштабі.

Найважливішою метою будь-якого біотехнологічного виробництва є забезпечення максимально сприятливих умов для росту культури, збільшення виходу цільового продукту. Це стосується як підтримки заданої температури процесу, рівня рН, так і складу і властивостей живильного середовища. Склад поживних середовищ повинен в найбільшій мірі відповідати потребам штаму-продуцента. Більш складні проблеми виникають при виробництві метаболітів, коли в ході періодичного процесу культивування склад середовища, що оточує клітини штаму-продуцента, повинен змінюватися в залежності від фази росту культури, її стану і рівня активності.

Біологічно-активні речовини, які продукують бактеріями і володіють антагоністичними властивостями, все активніше використовуються в якості основ лікарських засобів, що пригнічують ріст патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, злоякісних пухлин, а також нормалізують різні патологічні і біохімічні процеси в організмі людини [1].

Поряд з відомими бактеріями, в основному, представниками нормальної мікрофлори кишечника, досить добре вивченими в якості продуцентів біологічно-активних речовин, в останні роки активно досліджуються бактерії роду *Bacillus*. Вони є представниками транзиторної мікрофлори кишечника і привертають пильну

увагу дослідників, що займаються розробкою лікарських засобів медичного призначення на їх основі [2].

Біологічно-активні речовини, що виділяються при культивуванні *Bacillus*, поряд з пробіотичної активністю, представляють величезний інтерес в якості основи антимікробних препаратів, що діють вибірково на патогенні мікроби без різких порушень сформованого мікробіоценозу, зазвичай мають місце при застосуванні антибіотиків широкого спектру дії [3].

В усьому світі продукцію, що містить пробіотичні бактерії, широко використовують як для функціонального харчування, так і в лікувально-профілактичних цілях [4]. В охороні здоров'я вже близько 80 років застосовують препарати живих лактобактерій, біфідобактерій, долібактерій. Однак вони не завжди виявляють достатню антагоністичну дію по відношенню до патогенних штамів бактерій і деяких грибів, що дало поштовх до пошуку нових мікроорганізмів, таких як бактерії роду *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* [5].

Мета роботи: дослідити вплив стимуляторів росту на біосинтез спороутворювальних бактерій *B. clausii*

Для досягнення поставленої в роботі мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Зазначити важливі регулятори обмінних процесів, росту і розмноження мікроорганізмів;
2. Дослідити динаміку змін літичної активності мікроорганізму *B. clausii* за умови додавання стимуляторів росту.
3. З'ясувати вплив на літичну активність ферментів спороутворювальних бактерій *B. clausii* при застосуванні комплексу стимуляторів росту.

Об'єкт дослідження: біосинтез спороутворювальних бактерій *B. clausii*.

Предмет дослідження: спороутворювальні бактерії *B. clausii*.

Методи дослідження: біологічні, мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні.

Наукова новизна роботи. Полягає в отриманні даних, які свідчать що амінокислотам належить значна роль в стимуляції синтезу і активності літичних ферментів *B. clausii*. Виявлено вплив різних амінокислот. Найбільш ефективними

були: аргенін, аланін, триптофан, гістидин і фенілаланін. А такі амінокислоти як, гліцин, цистеїн та метіонін знижували літичну активність.

Практичне значення отриманих результатів. Спосіб збільшення літичної активності ферментів що продукують мікроорганізми *B. clausii* за умови додавання амінокислот може бути використаний під час розробки технології біосинтезу біологічно активних речовин.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Класифікація та функції біологічно активних речовин

Головним у дослідженні біосинтезу біологічно активних речовин є знання про методи і засоби виконання виробничих процесів отримання біологічно активних речовин (продуктів), з сировини (вихідного матеріалу) як шляхом хімічних реакцій, так і в процесі обміну речовин в живому організмі [33].

Біологічно активні речовини – хімічні сполуки, вони потрібні для підтримки життя живих організмів, володіють високою фізіологічною активністю при невеликих концентраціях по відношенню до деяких груп живих організмів чи їх клітинам, пухлин, вибірково затримуючи (або прискорюючи) їх зростання або повністю пригнічуючи їх розвиток [5].

За одиницю біологічної активності хімічної речовини приймають мінімальну кількість цієї речовини, здатне пригнічувати розвиток або затримувати зростання певного числа клітин, тканин стандартного штаму в одиниці живильного середовища [5].

На сучасному етапі існує велика кількість біологічно активних речовин різного застосування. Вони можуть бути отримані декількома шляхами: з живих мікроорганізмів, чи за допомогою хімічного синтезу [33].

Природні БАР можна отримати в процесі життєдіяльності живих організмів. Вони зазвичай утворюються в процесі обміну речовин, виділяючись в навколишнє середовище (екзогенні) або накопичуватися всередині організму (ендогенні). Процес синтезу БАР залежить від фізіологічних особливостей живих організмів, екологічних чинників [6].

До екзогенних природних БАР можна віднести:

– колліни – органічні сполуки, що виділяються вищими рослинами через кореневу систему, що викликають пригнічення нижчих рослин [6];

– фітонциди – леткі органічні сполуки, що виділяються вищими рослинами в атмосферне повітря, що викликають загибель патогенних мікроорганізмів[6];

– антибіотики – органічні речовини, продукти життєдіяльності мікроорганізмів в процесі обміну речовин, виділяються в навколишнє середовище або накопичуються всередині клітини, пригнічують або пригнічують інші види мікроорганізмів[6];

– маразміни – органічні речовини, що виділяються мікроорганізмами, що викликають пригнічення нижчих рослин[6];

– мікотоксини – біологічно активні речовини, що виробляються грибами в процесі обміну речовин, які виділяються в організм вищих рослин (злакових) при їх спільний розвиток, і викликають захворювання останніх. Небезпека мікотоксинів пов'язана з їх стійкістю при зберіганні, термічної обробці, здатністю швидко поширюватися в органах і тканинах організму, викликаючи пригнічення синтезу білка, ураження серцево-судинної системи, клітин кісткового мозку, лімфатичних вузлів [6]. Багато мікотоксини мають канцерогенні властивості.

– запашні речовини – органічні речовини, що володіють характерним приємним запахом.

Вплив одних живих організмів на інші за рахунок продукування БАР називається аллелопатія (рис. 1.1).

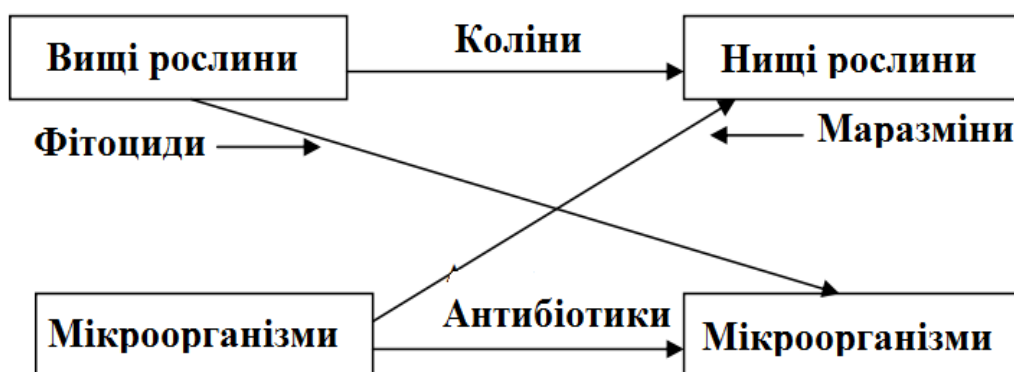


Рис.1.1. Схема аллелопатичних взаємодій живих організмів

Білки, вуглеводи, вітаміни, жири, ферменти, барвники, гормони, амінокислоти відносять до ендогенних БАР можна віднести.

Білки – природні полімери, молекули яких побудовані з залишків амінокислот. За своєю будовою білки діляться на прості і складні. Протеїни представляють собою прості білки. До них відносяться альбуміни, глобуліни, глютеміни [6].

Протеїди належать до складних білок, які крім білкових макромолекул включають в своєму складі небілкові молекули. Це нуклепротеїди (крім білка містять нуклеїнові кислоти), ліпопротеїди (крім білка містять ліпіди), фосфоліпіди (крім білка містять фосфорну кислоту). Білки відіграють значну роль в життєдіяльності клітини. Вони потрібні для утворення клітин, тканин організму, складають основу біомембрану, а також підтримки життєвих функцій живих організмів. Білки виконують каталітичні (ферменти), регуляторні (гормони), транспортні (гемоглобін, міоглобін), структурні (колаген, фіброїн), рухові (міозин), захисні (імуноглобулін, інтерферон) функції, що дозволяють знизити ризик інфекційних або стресових ситуацій, а також запасні (казеїн, альбумін), біоенергетичні функції. У свою чергу біологічна активність білків тісно пов'язана з амінокислотним складом [10].

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини, які високу високою біологічну активність і виконують роль біорегуляторів. Біологічна активність вітамінів залежить від того, що вони в якості активних груп входять до складу каталітичних центрів ферментів або є переносниками функціональних груп. Якщо недостатньо цих речовин, то відбувається зменшення активності відповідних ферментів і, як наслідок, послаблюються або повністю припиняються біохімічні процеси, що відбуваються за участю даних ферментів, це призводить до серйозних захворювань. Вітаміни поділяють на жиророзчинні і водорозчинні вітаміни [6].

Жиророзчинні вітаміни гарно розчиняються в органічних розчинниках. До них включають вітаміни груп А, Д, Е, Ф. Для них характерна наявність в молекулі гідрофобних заступників. Найбільшою біологічною активністю володіють незамінні жирні кислоти – вітаміни групи F (лінолева, ліноленова, олеїнова, стеаринова,

пальмітоолеїнової, пальмітинова, міристинова). Водорозчинні вітаміни добре розчинні у воді. До них належать вітаміни груп С, В, Д [6].

Ліпіди – це суміш органічних сполук з близькими фізико-хімічними властивостями, які беруть участь в побудові клітинних мембран. Тривала відсутність

в живому організмі призводить до порушення центральної нервової системи, знижується стійкість до інфекцій, скорочується тривалість життя [10].

Ферменти – біокаталізатори білкової природи, що прискорюють обмін речовин в клітинах. Поділяють ферменти на однокомпонентні (мономерні) ферменти, що складаються тільки з білка і двокомпонентні, які складаються з білкових макромолекул і небілкових молекул. Активність ферменту визначається структурою білкової частини. Ферменти використовуються в різних областях практичної діяльності людини як біологічні каталізатори [10].

Вуглеводи утворюються в рослинах в пластидах в процесі фотосинтезу під дією квантів сонячної енергії з вуглекислого газу, води, мінеральних солей завдяки асиміляції хлорофілу. За хімічним будовою вуглеводи діляться на моносахариди і полісахариди [35]. Найбільшою біологічною активністю володіють моносахариди, які є сильними відновниками.

Вуглеводи виконують пластичні функції (входять до складу тканин і рідин), захисні (гепарин запобігає згортання крові в судинах). При тривалій відсутності вуглеводу глюкози в крові відбувається порушення поведінки, марення, втрата свідомості, структурні зміни в мозку і в кінцевому підсумку може наступити смерть. Полісахариди (крохмаль, клітковина, пектинові речовини) відносяться до так званим баластні речовини. Вони прискорюють процес виведення з організму токсичних продуктів [34].

Найбільшою біологічною активністю володіють похідні моносахаридів – глікозиди, молекули складаються із залишків моносахаридів і спиртів, ароматичних сполук, стероїдів.

Фітогормони – речовини, які синтезуються в рослинах в процесі обміну речовин, транспортуються по ним і здатні викликати ростові або деформаційний

ефекти, так звані регулятори росту і розвитку рослин, або фіторегуляторів [35]. Фітогормони грають важливу роль в реалізації спадкової програми та адаптації до мінливих умов середовища, відповідають за формування і розвиток стебла, листа і кореня, прискорюючи диференціювання клітин, клітинні ділення, утворення нових тканин і органів, темпи зростання і розвитку рослин, їх продуктивність і якість врожаю [35]. Біологічні особливості транспортування фітогормонів полягають в тому, що, що утворилися в одному органі (наприклад, в апікальній меристемі стебла), вони повинні регулювати ріст в іншому органі (корені) [35].

За фізіологічною дією фітогормони підрозділяють на ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизової кислоти, етилен, брасиностероїдів. Фітогормональні властивостями мають деякі органічні кислоти (жасмінова, саліцилова), олігосахариди, поліаміни, фенольні сполуки.

Лікарські препарати є біологічно активними речовинами ендо- або екзогенної природи, законодавчо дозволені для профілактики і лікування захворювань людини. Ці речовини при певних концентраціях повинні надавати чітко виражені бактерицидну, антисептичну, наркотичне, дезінфікуючий і інші дії [6].

Терапевтичний ефект лікарських препаратів визначається дозою. При певних дозах лікарські препарати можуть привести до отруєння або смерті. Терапевтична дія надають і БАР, утворюються в організмі рослин, тварин і людини (антибіотики, алкалоїди, вітаміни, гормони) [6].

1.2. Сучасні уявлення щодо пробіотиків

Пробіотики – живі, непатогенні бактерії, які колонізують травний канал людини, модифікуючи його мікрофлору з користю для організму хазяїна. Пробіотики є живими мікроорганізмами, які при введенні в адекватних кількостях, в ідеалі, надають користь для здоров'я організму – як визначено Всесвітньою організацією охорони здоров'я [37] (ВООЗ).

Пробіотик – це продукти мікробіологічного походження, що включають живі або вбиті мікроорганізми чи їх компоненти та метаболіти. Пробіотики містять в

своєму складі апатогенні для людини мікроорганізми, мають антагоністичну активність відносно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і забезпечують відновлення нормальної мікрофлори [7].

Основні групи пробіотиків [7]:

- препарати на основі живих мікроорганізмів (монокультури або їх асоціації) ;
- препарати на основі метаболітів або структурних компонентів мікроорганізмів – представників нормальної мікрофлори;
- препарати на основі сполук мікробного або іншого походження, що стимулюють ріст і активність біфідобактерій і лактобацил – представників нормальної мікрофлори;
- препарати на основі комплексу живих мікроорганізмів, їх структурних компонентів, метаболітів в різних поєднаннях і з'єднань, що стимулюють ріст представників нормальної мікрофлори;
- препарати на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів і метаболітів із заданими характеристиками;
- препарати продукти харчування на основі живих мікроорганізмів, їх метаболітів, інших сполук мікробного, рослинного або тваринного походження, здатні підтримувати і відновлювати здоров'я через корекцію мікробної екології організму господаря.

Мікроорганізми, використовувані в якості продуцентів, класифікують на 4 групи: аероби – спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*; анаероби – спороутворюючі бактерії роду *Clostridium*; бактерії, які продукують молочну кислоту (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*); дріжджі – використовуються в якості сировини при виготовленні пробіотиків [10].

Сучасні біотехнологічні підприємства виготовляють пробіотики, синбіотики, закваски прямого внесення, антибіотики, імуномодулятори, вітаміни, біогенно активні пептиди, біосенсиори тощо на основі представників нормальної анаеробної мікрофлори людини й тварин [7]. За однією з сучасних класифікацій пробіотики поділяються на 7 поколінь (табл. 1.1).

Пробіотики випускаються у різних формах, а саме: ліофільно висушена біомаса у флаконах та ампулах; ліофільно висушена біомаса у желатинових капсулах; супозиторії ректальні та вагінальні з ліофільно висушеної біомаси; ліофільновисушена біомаса, пресована в таблетки, вкриті розчинною у кишечнику оболонкою; лінгвальні таблетки, що розсмоктуються під язиком [8].

Таблиця 1.1

Пробіотичні препарати різних поколінь [9]

Пробіотики	Склад мікрофлори	Концентрація клітин, КУО/дозу
I покоління – пробіотики на осові монокультур облигатної або факультативної нормофлори		
Біфідумбактерин	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ⁹
Колібактерин	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁹
Лактобактерин	<i>Lactobacillus fermentum</i>	10 ⁸
II покоління – 2-4-компонентні пробіотики на основі облигатної, факультативної або транзиторної флори		
Біфікол	<i>B. bifidum, E. Coli</i>	10 ⁸
Біфіформ	<i>Bifidobacterium longum, Enterococcus faecium</i>	10 ⁷
Лінекс	<i>Bifidobacterium infantis, Lactobacillus acidophilus, E. Faecium</i>	10 ⁷
Капсули йогурту	<i>L. acidophilus, Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, B. bifidum, Streptococcus lactis sp. lactis</i>	10 ⁹
III покоління – пробіотики на основі транзиторних мікроорганізмів		
Бактисубтил	<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁹
Біоспорин	<i>Bacillus subtilis, B. Licheniformis</i>	10 ⁹
Ентерол-250	<i>Saccharomyces boulardii</i>	10 ⁷
А-бактерин	<i>Aerococcus viridans</i>	10 ⁸
Ентерожерміна	<i>Bacillus clausii</i>	10 ⁹
IV покоління – синбіотики (комбінація пробіотиків і пребіотиків) та іммобілізовані пробіотики		
Екстралакт	<i>L. acidophilus</i>	10 ⁸
Біфілакт-екстра	<i>B. bifidum</i>	10 ⁸
Біфідумбактерин-форте	<i>B. bifidum</i>	10 ⁷
V покоління – препарати на основі		
Субалін	<i>B. subtilis</i>	10 ⁹
VI покоління – полікомпонентні пробіотики на основі лактобацил і біфідобактерій		
Probiotic	<i>Lactobacillus</i>	10 ⁹
Біфідум-Мульти-1,2,3	<i>Bifidobacterium</i>	10 ⁹
Полібактерин	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	10 ⁹

VII покоління – мультипробіотики		
Симбітер	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium, Propionibacterium, Lactococcus</i>	10^9
Симбітер концентрований		10^{13}
Симбітер-2		10^{12}
Симбітер-М		10^9-10^{12}
Апібакт		10^{12}

За напрямком дії, пробіотики можна класифікувати на такі групи: використовувані для забезпечення функціонального харчування; використовувані для реабілітаційної терапії і нормалізації мікробіоценозу після тривалого застосування антимікробних засобів (антибіотики, сульфаніламід, нітрофуран); застосовувані для корекції імунітету, стимуляції росту та розвитку [38]; застосовувані для терапії при захворюваннях бактеріальної і вірусної етіології.

Травний тракт являє собою мікробіоценоз, що забезпечує захист і розвиток організму. З самого початку життя в шлунково-кишковий тракт знаходиться безліч різноманітних груп мікроорганізмів, однак не всі вони можуть жити в кишковокишковому. У процесі еволюційного розвитку сформувався певний мікробіоценоз кишковокишківника, обумовлений постійною нормальною, або резидентною, мікрофлорою [9].

Кишковокишківник заселяється чужорідною мікрофлорою, проте, кишкова імунна система зберігає нормальний гомеостаз і фактично толерантна до більшості кишкових мікроорганізмів. Толерантність відображає переваги, властиві постійній кишковій мікрофлорі, що забезпечує організм господаря деякими поживними речовинами, включаючи жирні кислоти, а також вітамінами К і групи В, амінокислотами, колонізуюча шлунково-кишковий тракт і постійно присутня в ньому, нормофлора забезпечує основну захисну функцію макроорганізму, в той час як мікроорганізми є транзиторними [9].

Волочно-кислі і біфідобактерії є основними представниками мікробіоценозу кишковокишківника. Популяції мікроорганізмів розташовані на поверхні слизової оболонки, приєднуючись до мембран ентероцитів, або локалізовані в безпосередній близькості від поверхні епітелію, в шарі муцини, що покриває мембрани епітеліальних клітин. З урахуванням цього принципу мікроорганізми, асоційовані зі слизовою оболонкою, становлять мукозну мікрофлору [11].

Постійна присутність в кишечнику на його стінці резидентних мікроорганізмів запобігає розмноженню патогенів. Кишкові бактерії захищають організм від патогенів, а також формують першу лінію захисту. Завдяки успішній конкуренції за необхідні поживні речовини або за епітеліальні сайти прикріплення, бактерії кишечника запобігають кишковій колонізації патогенними мікроорганізмами. Утворюючи антимікробні сполуки, енергозалежні жирні і хімічно модифіковані жовчні кислоти, бактерії кишечника створюють локальну навколишнє середовище, несприятливу для розвитку патогенних мікроорганізмів [7]. Резидентна кишкова мікрофлора стимулює відновлення імунних клітин підслизового шару, який утворює другий шар захисту [9].

Найбільш важливими аспектами взаємодії пробіотичних штамів з мікрофлорою кишечника і організмом є утворення антибактеріальних речовин, конкуренція за поживні речовини і місце адгезії, зміна мікробного метаболізму (збільшення або зменшення ферментативної активності), стимуляція імунної системи [7].

1.3. Фармакологічна дія пробіотиків

Пробіотики мають різнобічну фармакологічну дію. Терапевтичний ефект пробіотиків зумовлений їх участю в процесах травлення і метаболізму організму-господаря, біосинтезу і засвоєнням білка і багатьох інших БАР, забезпеченням резистентності макроорганізмів. Нормальна діяльність багатьох систем і органів в значній мірі залежить від видового складу та міжвидового співвідношення мікроорганізмів, що заселяють їх з моменту народження [12].

Участь мікроорганізмів в азотистому (білковому) харчуванні є однією з основних їх функцій. В результаті певних біохімічних процесів, що відбуваються в шлунково-кишковому тракті, мікроорганізми, засвоюючи надходять поживні речовини, розвиваються, ростуть і швидко збільшують свою кількість [11].

Симбіотична мікрофлора завдяки ферментаційній активності може синтезувати велику кількість біологічно активних речовин: органічні кислоти,

спирти, ліпіди, вітаміни, особливо групи В. Потрапляючи у кровоносне русло, багато з цих речовин активно беруть участь в енергетичному і вітамінному обміні, відіграючи важливу роль в життєзабезпеченні організму господаря [9].

Органічні кислоти сприяють покращенню перистальтики і секрецію кишкового, що сприяє перетравленню їжі і підвищує резорбцію кальцію і заліза. Поліфосфати бактерій приймають участь в перенесенні цукрів у клітину, виконуючи функцію гексокінази [12].

Пробіотики також використовуються для зміцнення імунної системи, подолання синдрому хронічної втоми, при алергії, в разі розлади уваги, мігрені, астми, фарингіту, бронхітів і пневмоній, синуситів, отитів, діареї, запору, дисбактеріозу, кандидозу, гепатитів, ревматоїдного й артриту, остеоартрозу (остеоартрит) і остеохондрозу, остеопорозу, цукровому діабеті, гіпоглікемії, гіпотиреозу, циститу, фіброзно-кістозної мастопатії, поліпшення здоров'я шкіри, вугрів, афтозного стоматиту, періодонтиту (періодонтит), алкоголізму, ожиріння [7].

Пробіотики необхідні в разі [9]:

– багато порушень травлення і захворювання ШКТ: метеоризм, печія, діарея, запор, ферментативна недостатність; атонія кишечника, хронічні захворювання шлунково-кишкового тракту, стану після операцій на органах черевної порожнини, тривалі кишкові дисфункції невстановленої етіології, стану після кишкових інфекцій;

– рецидивні інфекції сечовивідних і статевих шляхів, часті інфекції дихальних шляхів, бронхоектатична хвороба, стійкі до антибіотикотерапії синусити, бронхіти, аднексити та ін [1].;

– ревматичні захворювання; вагітність і годування груддю; гострі і хронічні психоемоційні стреси, астеничні стани, хронічна втома, різка зміна кліматичної зони і часового поясу при відрядженнях і подорожах (діарея мандрівників) і ін [1].

При застосованні препаратів в терапевтичних цілях застосовують такі, які включають в своєму складі пробіотики, а саме: біфідовмісні препарати, лактозмісні біопрепарати, колівмісні препарати.

Біфідовмісні препарати (біфідумбактерин, біфідумбактерин форте, пробіфор, біфіліз, біфіформ). Діючою речовиною цих препаратів є живі біфідобактерії, які мають антагоністичну активність проти широкого спектра патогенних і умовно-патогенних бактерій, основне призначення – забезпечення швидкої нормалізації мікрофлори кишкового і уrogenітального трактів [38].

Біфідовмісні препарати застосовуються з метою нормалізації мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту, підвищення неспецифічної резистентності організму, стимуляції функціональної діяльності травної системи, для профілактики госпітальних інфекцій в пологових будинках і лікарнях [9].

Препарати призначаються дітям і дорослим при лікуванні: гострих кишкових інфекцій (шигеліоз, сальмонельоз, стафілококовий ентероколіт, харчова токсикоінфекція), широко використовуються при лікуванні захворювань травного тракту, що супроводжуються розвитком дисбактеріозу (виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки, панкреатит, холецистит, хронічні захворювання печінки і жовчовивідних шляхів), при алергічних захворюваннях, пневмоніях, гострих і хронічних бронхітах, що супроводжуються дисбактеріозами [38].

Препарати призначають при запальних захворюваннях уrogenітального тракту, хворим хірургічного профілю із захворюваннями кишечника, печінки, підшлункової залози в період передопераційної підготовки і після операцій з метою корекції мікробіоценозу кишечника. З огляду на порушення мікрофлори кишечника, препарати широко призначаються після проведення курсу етіотропної терапії, при застосуванні гормонів, нестероїдних протизапальних препаратів, променевої терапії [39].

Препарат доцільно застосовувати при гострих і хронічних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, при ранньому переводі дітей грудного віку на штучне вигодовування, в комплексному лікуванні дітей (в тому числі новонароджених), хворих на пневмонію, сепсисом та іншими гнійно-інфекційними захворюваннями, для профілактики або попереджеї розладів функції кишечника у дорослих і запобігання виразково-некротичного ентероколіту, лікування та профілактики дисбактеріозів, а також місцево з метою профілактики маститу. Препарат також

призначають для лікування і профілактики захворювань жіночої статеві сфери, що супроводжуються вагіноз і дисбактеріозом кишечника [39].

Лактовмісні біопрепарати доцільно призначати дітям і дорослим при лікуванні ГКІ, хронічних захворювань шлунково-кишкового тракту з вираженими, особливо в разі дефіциту лактофлори або при необхідності використання цих препаратів в комбінованій терапії з антибіотиками. Досвід останніх років показав, що застосування лактовмісних препаратів у високому ступені ефективно для лікування хворих з гострими вірусними і іншими кишковими інфекціями, замість призначення їм антибактеріальних препаратів [39].

Колівмісні препарати: колібактерин, біфікол та біофлор. Механізм дії є багатофакторним; володіють антагоністичною активністю щодо широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, включаючи шигели, сальмонели, протей; надає коригуючий вплив на порушений мікробіоценоз; стимулює місцеві репаративні процеси в кишечнику; сприяє поліпшенню травлення і обміну речовин; стимулює природні фактори захисту. Застосовується для лікування хворих хронічним колітом різної етіології [39].

1.4. Теоретичні основи синтезу біологічно активних речовин

Біологічно активні речовини являють собою складні органічні сполуки, активність яких залежить від структури молекули і розташування функціональних груп.

Серед широкого спектру БАР особливий інтерес представляють лікарські речовини, головна особливість яких полягає в тому, що вони призначені для введення всередину організму людини або тварин і необхідні для підтримки життєдіяльності живих організмів і їх фізіологічної активності. При синтезі цього типу БАР необхідно враховувати вимоги, які пред'являє до них медицина [40].

Біологічна активність лікарських препаратів пов'язана з змінами функцій організму, які можуть порушуватися або залишатися незмінними. При попаданні в організм біологічні системи (органи, тканини) активно взаємодіють з лікарськими

препаратами в процесі обміну речовин, зазнаючи ряд перетворень на шляху його дії з утворенням метаболітів. взаємодія може відбуватися в водному (біологічні рідини) або в ліпофільному (біологічні мембрани) середовищі. В цьому випадку слід враховувати фактор середовища [40].

У промисловому масштабі найбільше значення мають хімічний і мікробіологічний методи.

1.4.1. Хімічний метод синтезу біологічно активних речовин

Хімічний метод синтезу БАР носить назву тонкого органічного синтезу, відміними особливостями якого є [40]:

- багатостадійність отримання речовин;
- необхідність ретельного очищення;
- невеликі обсяги виробництва;
- великий асортимент;
- висока вартість продуктів синтезу.

В основу вибору способу синтезу БАР повинні бути покладені знання про механізм хімічних реакцій, властивості, які використовуються для синтезу хімічних попередників, відомості про раціональні методи їх отримання та очищення. Зазвичай в кожному синтезі можна виділити чотири частини [40]:

- вибір джерел сировини;
- розробка хімічної схеми синтезу БАР;
- вибір методу очищення цільового з'єднання;
- ідентифікація БАР.

Методи, використовувані в тонкому органічному синтезі, забезпечують отримання складних органічних сполук з простіших попередників. Для промислового виробництва продуктів тонкого органічного синтезу дуже важливо знайти найбільш зручний, безпечний і дешевий спосіб отримання таких попередників [40].

Вибір джерел сировини. Правильний вибір є одним з визначальних моментів в синтезі. Найбільш важливими джерелами сировини є продукти первинної переробки вугілля, нафти і природного газу. Так, при хімічної переробки вугілля отримують ароматичні вуглеводні (бензол, толуол, ксилол, нафталін) і газоподібні оксиди вуглецю. При крекінгу і риформінгу нафти отримують аліфатичні, ациклічні, ароматичні та гетероциклічні вуглеводні, з природного газу – метан, етан, пропан, бутан, пентан, гексан, вищі парафіни [41].

При перетворенні продуктів вугле-, нафто- і газопереробки можна отримати спирт, фенол, альдегіди, кетони, кислоти [39].

Для виробництва мінеральної сировини використовують переважно рудні копалини. Мінеральна сировина застосовують для виробництва неорганічних солей (KI, KMnO₄). Для отримання БАР використовуються також рослинні і тваринні матеріали [40].

Дуже важливий внесок в сировинну базу внесло виробництво синтезгаз, з якого отримують метанол, вищі вуглеводні. З монооксиду вуглецю отримують фосген, мурашину кислоту, з метану – синильної кислоти, сірковуглець і хлорпохідні [40].

Синтез багатьох сполук-попередників засновані на використанні ацетилену, який в свою чергу отримують з бікарбиду кальцію термоокислюючим піролізом метану або крекінгом вуглеводнів рідких нафтових фракцій [41].

Більш складні вихідні з'єднання отримують переробкою сільськогосподарської, лісохімічного і мікробіологічного сировини (жири, масла, крохмаль, білки і т. д.). Доступність і вартість одного і того ж виду сировини може змінюватися з плином часу внаслідок різних причин, тому при розробці нових синтезів важливо враховувати прогнози по виробництву з'єднань-попередників [41].

Розробка хімічної схеми синтезу. Найбільш складним є створення хімічної схеми отримання речовини. Зазвичай починають з розгляду структури цільового з'єднання і аналізу відомих хімічних реакцій, які можуть привести до нього виходячи з більш простих з'єднань-попередників [41]. При цьому можливі дві принципово відмінні одна від одної ситуації. Якщо метод синтезу цільового

з'єднання невідомий, в цьому випадку основне завдання полягає в підборі хімічної реакції або поєднання кількох хімічних реакцій, які можуть привести до даного з'єднання. Якщо ж можливі кілька схем синтезу, то задача зводиться до вибору найбільш раціонального шляху [41].

При виборі промислового способу синтезу необхідно враховувати доступність реагентів, їх вартість, склад продуктів, що утворюються, можливість утилізації відходів. При використанні реакції окислення більш кращі каталітичні методи [1].

При синтезі більш складних речовин труднощі зростають. Особливо складні синтези оптично активних речовин. Все різноманіття хімічних перетворень, з якими доводиться мати справу в процесах тонкого органічного синтезу, можна об'єднати в кілька груп, кожна з яких характеризується загальними прийомами проведення хімічних реакцій [41]:

- перетворення наявних в молекулі заступників;
- введення нових заступників;
- елімінування заступників;
- циклізація;
- перегрупування;
- проведення регіо- і енантіоселективних реакцій.

У межах кожної групи зазвичай використовують кілька типових процесів. Так, при перетвореннях наявних заступників широко застосовують реакції окислення, відновлення і конденсації, для введення нових заступників – реакції галогенування, сульфування, нітрування, алкілування [41].

Для отримання БАР хімічним способом використовують такі методи проведення хімічних реакцій [40]:

- перетворення наявних в молекулі заступників (реакції окислення, відновлення, конденсації);
- введення нових заступників (реакції галогенування, сульфування, нітрування, алкілування);
- елімінування заступників для створення ненасичених зв'язків;

– циклізація шляхом розкриття ненасичених зв'язків або проведенням реакції з виділенням води, спирту, вуглеводнів та ін;

– перегрупування дозволяють отримувати з'єднання з певним розташуванням заступників шляхом зменшення числа вуглеводневих атомів в молекулі або шляхом нарощування числа вуглеводневого ланцюга.

Вибір методу очищення цільового з'єднання залежить від агрегатного стану отриманих цільових сполук, які можуть містити домішки, що знижують якість отриманого продукту. Для рідких з'єднань очистку проводять шляхом перегонки, ректифікації, молекулярної дистиляції. Кристалічні сполуки піддають кристалізації з розчинників [29]. Для більш ретельного очищення використовують хроматографічні методи (іонообмінні, на твердих адсорбентах).

Ідентифікація цільового продукту проводять для оцінки його якості. З цією метою спочатку визначають фізико-хімічні константи (температуру кипіння, температуру плавлення, показник заломлення, щільність і т.д.), а потім підтверджують структуру цільового з'єднання спектральними методами (УФ, ІЧ, ЯМР), мас-спектроскопією, рентгеноструктурним аналізом [29].

1.4.2. Мікробіологічний метод синтезу біологічно активних речовин

В основі технології біосинтезу БАР головними компонентами є біоб'єкти: вірус, гриб, рослинні або тваринні клітини, біомолекули, що володіють різними фізіологічними властивостями [42].

Основне завдання технології біосинтезу БАР – перетворення природної сировини або відходів за допомогою біологічного об'єкта (мікроорганізмів, ізольованих клітин, ферментів, клітинних органел), підтримка та активізація шляхів обміну клітин, що ведуть до накопиченню БАР в цільовому продукті при помітному придушенні інших реакцій обміну у культивованого організму, а також отримання клітин або їх складових частин (переважно ферментів) для спрямованої зміни складних молекул [9].

Залежно від біооб'єкту, використовуваного в технологічному процесі біосинтезу БАР, можна виділити галузі в яких застосовується біотехнологія згідно рисунку 1.2.

Принципи мікробіологічного синтезу БАР ґрунтуються на приналежності біооб'єктів до надцарства живих істот; функціональної активності біооб'єкту (біосинтез, біотрансформація), (таб. 1.2); можливості виокремлення окремих етапів з біотехнологічних схем виробництва у вигляді самостійних процесів (підготовка поживних середовищ і обладнання, ферментація, стерилізація середовищ і обладнання) [37].

Переваги біотехнології: простота організації генома; легка пристосовуваність (лабільність) до середовища проживання в природних і штучних умовах; досить високі швидкості протікання ферментативних реакцій при низьких температурах (від 20 °С до 60 °С) і накопичення клітинної маси; можливість використання недефіцитної, дешевої сировини (відходи промисловості, стічні води) [36].

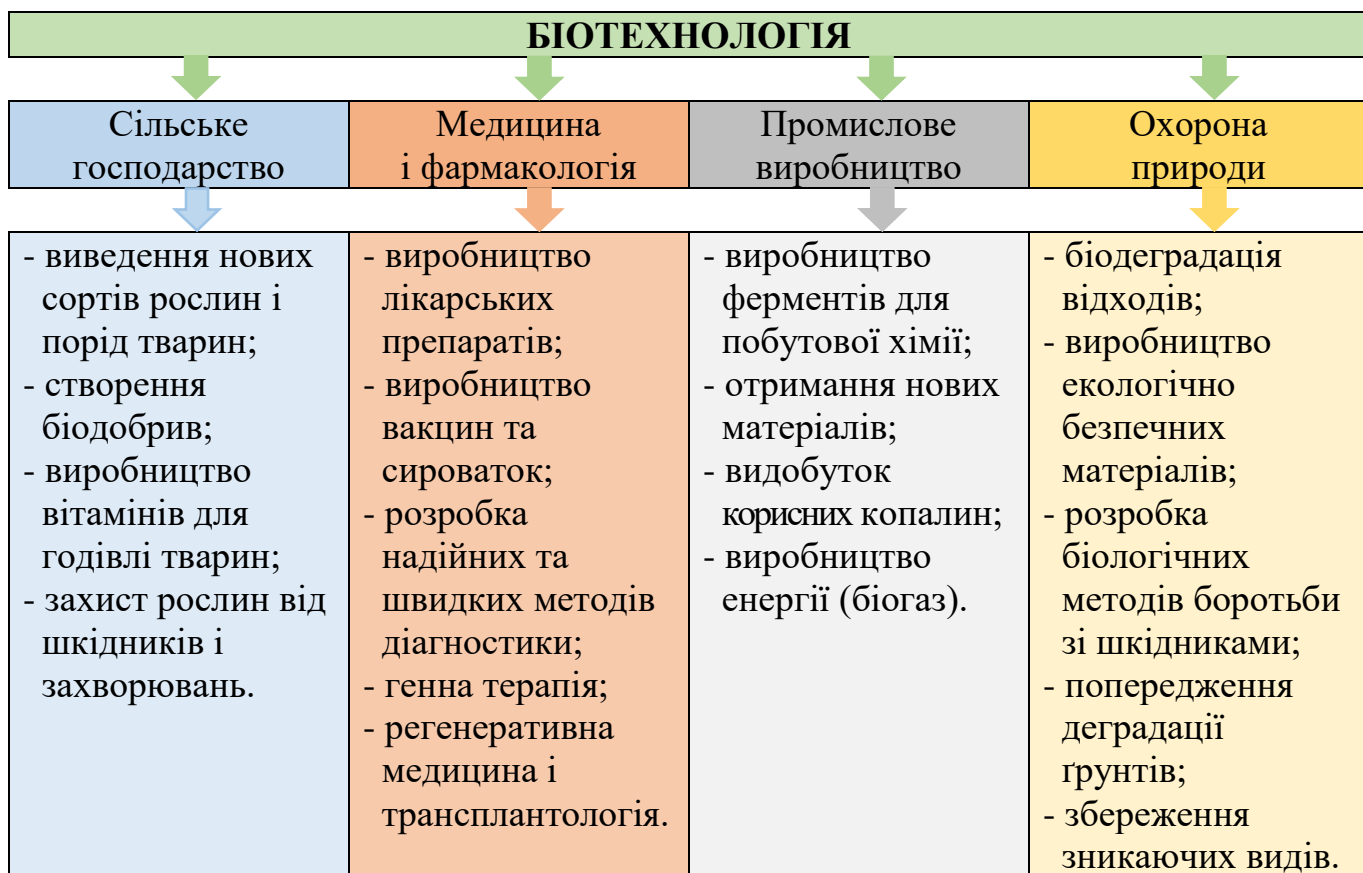


Рис. 1.2. Галузі застосування біотехнології

До недоліків технології мікробного синтезу БАР можна віднести: багатокомпонентність поживних середовищ; необхідність стерилізації поживних середовищ, обладнання та комунікацій для видалення або руйнування контамінантів при збереженні якості середовища, а також труднощі в управлінні процесом біосинтезу і автоматизації. Це пов'язане з процесами саморегуляції біооб'єктів (включаючи здатність до мутації), які можуть привести до непередбаченої зміни біотехнологічного процесу. При розмноженні і розвитку відбувається постійна зміна окремих параметрів, і в кожен момент часу клітини функціонують в інших умовах. У зв'язку з цим при управлінні технологічним процесом біосинтезу БАВ слід враховувати індивідуальні особливості «поведінкових реакцій» біооб'єкту в конкретних умовах культивування, а саме: чутливість біооб'єктів до впливу фізико-механічних факторів при перемішуванні, а також знання хімічної природи синтезованого БАР, характеру біохімічних процесів, що здійснюються біооб'єктами, специфіку спадкових властивостей даного виду [40].

Таблиця 1.2

Процеси в промисловій мікробіології

Характеристика процесу	Цільові продукти	Назва цільових продуктів
Біосинтез	Метаболіти	Амінокислоти, нуклеозиди, нуклеотиди
	Первинні	Нуклеїнові кислоти, ферменти
	Вторинні	Алкалоїди, антибіотики, гібереліни, глікани і гліконьюгати, органічні кислоти, спирти, ліпіди, амінокислоти, пептидні гормони біосинтез
	Клітинна маса	Пекарські та харчові дріжджі, кормовий і харчової білок, вакцини і антигенні речовини
Трансформація	Неорганічні речовини	Виявлення металів, збагачення металів
	Переважно органічні речовини	Виявлення металів
		Збагачення металів
		Компостування відходів, отримання біогазу
		Детоксикація, дезодорація і

		знешкодження, наприклад, поверхнево-активних речовин
		Визначення (аналіз) речовин за продуктами трансформації
		Кисломолочні продукти і сири
		Хлібобулочні вироби
		Квашення і соління овочів
		Силосування кормів
		Мочка льону і джуту
		Ферментація чаю, тютюну, кави, какао, маслин
		Пивоваріння, виноробство, винокуріння

Основні технологічні показники біосинтезу БАР. Для нормального росту, розмноження біооб'єкту в процесі біосинтезу БАР необхідно підтримувати оптимальні умови його культивування. При порушенні оптимальних умов порушується обмін речовин, припиняється або обмежується зростання і розмноження

культури, знижується вихід і якість цільового продукту [39].

Параметри контролю процесу культивування, що відносяться до основним технологічним показниками біосинтезу БАВ [42]:

- температура;
- рН середовища;
- кількість біомаси клітин;
- швидкість споживання джерел живлення;
- кількість розчиненого кисню (у разі аеробних біооб'єктів);
- кількість утворюється метаболіти.

Основні технологічні стадії мікробіологічного синтезу БАР: предферментація (підготовчі роботи); ферментація (накопичення і виділення цільового продукту) [42].

Предферментація включає підготовчі стадії до біосинтезу:

- приготування і підготовка середовища;
- отримання і підготовка посівного матеріалу;
- вибір і підготовка обладнання.

Основна стадія в підготовці обладнання, поживних середовищ, посівного матеріалу полягає в стерилізації. стерилізації підлягають піногасники, рідкі добавки, комунікації, датчики. Необхідність стерилізації викликана тим, що мікроорганізми-контаминанти не тільки можуть придушити функціональне розвиток біооб'єкту в силу конкуренції і антибіоза, а й дезорганізувати будь-яку тканину або середовище вирощування. Деякі з них здатні продукувати токсичні речовини, які можуть потрапити в цільовий продукт [39].

Ферментація проводиться в виробничих біореакторах. За біохімічної суті вона багато в чому імітує предферментацію. В процесі ферментації також необхідно використання стерильні поживні середовища, повітря і біореактор, вибір яких обумовлений загальними вимогами біооб'єктів [40].

Ферментацію слід здійснювати в герметичних біореакторах щоб уникнути розсіювання біооб'єкту в зовнішнє середовище, так як деякі з них виділяють екзотоксини.

1.5. Стимулятори росту та їх вплив на біосинтез мікроорганізмів

Крім елементів мінерального живлення, джерел вуглецю та енергії, які повинні входити до складу поживного середовища, багато які мікроорганізми потребують додаткових речовин, які називаються факторами росту (стимуляторам росту). Ці речовини входять до основного складу клітини, але деякі організми не можуть їх самі синтезувати [10].

Фактори росту можна віднести до трьох груп (рис. 1.3) : амінокислоти; пурини та піримідини; вітаміни та споріднені сполуки, які потрібні в дуже малих кількостях [10]. Амінокислоти, пурини та піримідини входять до складу білків і нуклеїнових кислот, тому клітина потребує їх у достатніх кількостях. Вітаміни входять до складу коферментів або простетичних груп, тобто беруть участь у каталітичних функціях, тому вони необхідні в дуже малих кількостях [10].

Амінокислоти	Триптофан, лізин, холін, глютамінова к-та, аргінін, метіонін, валін, лейцин, треонін, гістидин, фенілаланін і ін
Пурини та піримідини	Аденін, гуанін, ксантин, гіпоксантин, цитозин, тимін, урацил
Вітаміни	Біотин (вітамін Н), вітаміни групи В: В ₁ (тіамін), В ₂ (рибофлавін), В ₃ (пантотенова кислота), В ₄ (холін), В ₅ (нікотинамід), В ₆ (пиродоксин), В ₇ (гемін), вітамін К

Рис. 1.3. Групи стимуляторів росту мікроорганізмів

Потреби в бактеріальних факторах росту різних видів мікроорганізмів широко варіюють. Відповідно до сучасних уявлень потреби в бактеріальних факторах росту виникли внаслідок втрати здатності бактеріальними клітинами синтезувати їх в результаті мутацій. Ця концепція отримала підтвердження в ряді генетичних і біохімічних досліджень [12]. Було показано, що види, які не потребують певних бактеріальних факторів росту, здатні синтезувати ці чинники. Різноманітність потреб в бактеріальних факторах зростання у мікробів різних видів і різних штамів одного виду є результатом мутацій в генах, що детермінують структуру ферментів, які беруть участь в синтезі певних бактеріальних факторів росту. Однією з найбільш численних груп бактеріальних факторів росту є вітаміни [43].

Бактеріальні фактори росту для *Clostridium acetobutylicum* і ряду інших бактерій є параамінобензойна кислота. Важливою властивістю параамінобензойної кислоти є її здатність запобігати бактеріостатичній дії сульфаніламідів [10].

Фолієва кислота є бактеріальним факторів росту для *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* і інших мікроорганізмів. Метаболічно активними похідними фолієвої кислоти є її відновлені форми, в синтезі яких використовується в якості попередника параамінобензойної кислоти. Сульфаніламід блокують реакції переходу параамінобензойної кислоти в відновлені похідні фолієвої кислоти. Подібні реакції характерні для мікробної клітини, але не для клітин вищих організмів, що і визначає причину бактеріостатичної дії сульфаніламідів на бактерії при відносно меншому шкідливому впливі на клітини людини і вищих тварин [43].

Біотин (вітамін Н) є термостабільним бактеріальним фактором зростання для великої кількості патогенних і сапрофітних мікроорганізмів. Однією з найбільш важливих функцій біотину є його участь в реакціях карбоксилювання кетокислот.

Нікотинова кислота і її похідні: нікотинамід (вітамін РР), потрібні як бактеріальні фактори росту для різних патогенних і сапрофітних мікроорганізмів [42].

Пантотенова кислота (вітамін В₃) є бактеріальним фактором зростання для дріжджів, а також деяких видів молочнокислих та інших бактерій. При гідролізі пантотенова кислота розпадається на пантонову кислоту і β-аланін. Пантотенова кислота бере участь в біохімічних реакціях як складова частина коферменту А, який здійснює реакції ацетилювання [39].

Рибофлавін (вітамін В₂) входить як простетична група до складу багатьох ферментів, які беруть участь в окисно-відновних реакціях, і є бактеріальним фактором зростання для молочнокислих бактерій і патогенних стрептококів [44].

Тіамін (вітамін В₁) є бактеріальним фактором зростання для багатьох видів мікроорганізмів. Для росту деяких гонококів тіамін потрібно в формі пірофосфату. Тіамін входить до складу коферментів, які беруть участь в реакціях декарбоксилювання [44].

Вітамін В₁₂ потрібний в дуже незначних кількостях для зростання *Lactobacillus* і мутантних штамів *E. coli*. У природі вітамін В₁₂ синтезується виключно мікроорганізмами. Однак більшість мікроорганізмів це з'єднання не синтезує і не вимагає його для зростання. Вітамін В₁₂ може перебувати в формі коферменту. Вітамін В₁₂ бере участь також в біосинтезі серина, метіоніну, тиміну і пуринових основ [44].

Амінокислоти поряд з вітамінами є численною групою бактеріальних факторів росту. Клітини багатьох видів мікроорганізмів здатні синтезувати всі амінокислоти самостійно, але зустрічаються види, що вимагають для зростання кількох амінокислот. Так, *Streptococcus equinus* вимагає для зростання 17 амінокислот. Потреби мікроорганізмів у амінокислотах можуть змінюватися в залежності від

складу середовища. Потреба в амінокислотах може виникнути за рахунок генетичного порушення одного з етапів біосинтезу певних амінокислот [39].

Пуринові і піримідинові основи: аденін, гуанін, гіпоксантин, ксантин, цитозин, урацил, рибонуклеозид і дезоксирибонуклеозид є складовими частинами і попередниками нуклеїнових кислот і потрібні як бактеріальні фактори росту для деяких мікроорганізмів [43].

Знання потреб різних видів мікроорганізмів в певних бактеріальних факторах зростання є важливим для ідентифікації патогенних мікробів. Медичне значення бактеріальних факторів росту визначається необхідністю створення відповідних поживних середовищ, що необхідно для мікробіологічної діагностики інфекційних захворювань. Крім того, ряд бактеріальних факторів росту використовується для створення оптимальних умов культивування вакцинних штамів [41].

1.6. Висновки до розділу

Отже, пробіотик – це продукція мікробного походження, що містить живі або вбиті мікроорганізми або їх компоненти та метаболіти. Мікроорганізми, використовувані в якості продуцентів, класифікують на 4 групи: *Bacillus*; *Clostridium*; *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*; дріжджі. Фактори росту поділяються на три групи: амінокислоти; пурини та піримідини; вітаміни. Ці речовини входять до основного складу клітини, але деякі організми не можуть їх самі синтезувати.

РОЗДІЛ 2

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД СИНТЕЗУ СПОРОУТВОРЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ *BACILLUS CLAUSII*

2.1. Об'єкти дослідження

2.1.1. Характеристика лікарського препарату «Ентерожерміна»

Для проведення експериментальної частини дипломної роботи використовувалася культура спороутворювальних бактерій *Bacillus clausii* яка була виділена з лікарського препарату «Ентерожерміна» [39].

Ентерожерміна – пробіотик антагоністичної дії, продукує антибактеріальну речовину родини бактеріоцинів щодо *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, патогенних штамів *Enterococcus faecium*, рота- і аденовірусів (рис. 2.1) [39].



Рис. 2.1. Пробиотик «Ентерожерміна»

В одній капсулі міститься: діюча речовина: 1 флакон 5 мл містить спори полірезистентного штаму *B. clausii* – 2×10^9 ; допоміжні речовини: вода очищена.

Фармакологічна дія. Препарат біологічного походження. Що складається з суспензії спор мікроорганізму *B. clausii*, який в нормі присутній в кишечнику, позбавленого патогенного дії. Завдяки своїй високій стійкості до хімічних і фізичних агентів, при пероральному прийомі суспензії *B. clausii* проникають через кислотний бар'єр шлункового соку в непошкодженому вигляді і досягають кишкового тракту, де вони перетворюються в метаболічно активні вегетативні клітини [39].

Прийом «Ентерожерміна» сприяє відновленню мікробної флори кишечника, що зазнала зміни в процесі порушень мікробної флори різної етіології, завдяки діяльності *B. clausii*. Більш того, оскільки *B. clausii* здатний виробляти різні вітаміни, зокрема вітаміни групи В, «Ентерожерміна» сприяє нормалізації порушень вітамінного балансу в організмі, викликаного антибіотиками і хіміотерапевтичними препаратами взагалі. Ентерожерміна дозволяє домогтися неспецифічного антигенного та антитоксического ефекту, тісно пов'язаного з метаболічною активністю *B. clausii* [13].

Препарат має високий ступінь гетерологічної резистентності до антибіотиків, що дозволяє застосовувати його як для профілактики зміни мікрофлори кишечника внаслідок селективного дії антибіотиків (особливо антибіотиків широкого спектру дії), так і для відновлення вже порушеного балансу мікрофлори кишечника [3].

Внаслідок цієї резистентності до антибіотиків, препарат «Ентерожерміна» можна призначати в проміжку між двома дозами антибіотиків. Антибіотична резистентність стосується пеніцилінів, цефалоспоринів, тетрациклінів, макролідів, аміноглікозидів, новобиоцин, хлорамфеніколу, тіамфеніколу, лінкоміцину, ізоніазиду, циклосерин, рифампіцину, налидиксової кислоти і піпемідової кислоти [4].

Препарат не взаємодіє з такими антибіотиками, як: пеніцилін при застосуванні не в комбінації з інгібіторами β -лактамази, цефалоспорици (часткова резистентність в більшості випадків), тетрациклін, макроліди, аміноглікозиди (за винятком гентаміцину і амікацину), хлорамфенікол, тіамфенікол, лінкоміцин, кліндаміцин, ізоніазид, циклосерин, новобиоцин, рифампіцин, налидиксова кислота і піпемідинова кислота (проміжна резистентність), метронідазол [41].

Високий пробіотичний ефект «Ентероерміна» пояснюється її резистентністю до дії агресивного вмісту верхніх відділів травного каналу – хлористої кислоти, пепсину, жовчних кислот. Доведено здатність спор бактерій *B. clausii* до часткової адаптації для виживання в агресивному середовищі шлункового вмісту протягом 120 хв при рН 2-7. При цьому вегетативні форми *B. clausii* втрачають життєдіяльність при рН 2 протягом 10 хв, а при рН 3 – 60 хв [39].

2.1.2. Властивості спороутворювальних бактерій *B. clausii*

Представники роду *Bacillus* можна виділити з води, пилу, ґрунту і повітря. *Bacillus* мають широкий спектр біологічної активності, проявляючи антагоністичну дію по відношенню до патогенної мікрофлори. У той же час вони синтезують пектини, целюлозу, ферменти, різні амінокислоти і антибіотики [11]. В організм людини *Bacillus* потрапляють випадково або в результаті прийому ферментативних продуктів харчування.

За сучасною класифікацією *B. clausii* відноситься до:

Домен: *Bacteria*

Філа: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *B. clausii*

Веgetативні форми бактерій живуть і розвиваються при $pH > 4,5$, а оптимальними середніми умовами для розвитку пробіотичних штаммов *B. clausii* є pH 8 [12]. *B. clausii* може розвиватися в рідкому та агаризованому середовищі в мікроаерофільних умовах, також можуть розмножуватися і в анаеробних умовах при додаванні натрію нітрату в середовище [13]. Можливість розвитку та розмноження *B. clausii* в умовах анаеробіозу при наявності в середовищі натрію нітрату свідчить про можливість адаптація бактерій до середовища кишечника, що можливо за рахунок високої концентрації цитохромів в алкілофільних бацилах [14]. Таким чином фізіологічні властивості *B. clausii* свідчать про можливість спорових форм розмножуватися, а вегетативних – виживати під час транзиту по травний тракт.

B. clausii потрапивши в шлунок здатні синтезувати амілази та ліпази. *B. clausii*, що знаходяться в складі «Ентерожерміни», синтезують велику кількість вітаміну B_2 . *B. clausii* володіють широким спектром резистентності до антибіотиків, які використовують для лікування: цефалоспорини, аміноглікозиди, канаміцин, тобраміцин, амікацин, макроліди, тетрациклін, рефампіцин [39].

Бактерії роду *Bacillus* мають виражену ферментативну активність. Протеази бацил стимулюють процеси травлення, підсилюючи продукцію вітаміну B_2 і знижуючи алергенність їжі [15], субтілізин і каталаза активізують зростання *Lactobacillus* [15].

Пробіотичні ефекти спороутворювальних бактерій при різних гострих і хронічних захворюваннях кишечника реалізуються в результаті [39]:

– їх антагоністичного впливу на патогенні бактерії за рахунок антибіотиків і ферментів, синтезованих вегетативними формами;

- стимуляції імунітетних клітин, активації утворення інтерферонів;
- поєднання зазначених чинників, включаючи транспортацію в кров, лімфу і внутрішні органи, що підсилює захисні сили організму в цілому.

2.1.3. Склад поживних середовищ для культивування

Поняття "поживне середовище", або середовище культивування включає якісний і кількісний склад вихідних компонентів, необхідних для енергетичного обміну, тобто біологічно активних (азот, фосфор, вуглець, мікроелементи, вітаміни, мінеральні солі, фактори росту), і фізико-хімічні фактори (температура, аерація). Поживні середовища класифікуються за консистенцією, складом, за призначенням (таб. 2.1) [43].

Процес приготування поживних середовищ включає вибір елементів харчування, необхідних продуцентам БАР для їх відтворення і біотрансформації. Підбір компонентів таких середовищ здійснюється емпірично і вимагає багато часу і навичок при оцінці того чи іншого компонента субстрату. До складу поживного середовища входять: вуглець, водень, кисень, азот, фосфор, сірка, калій, кальцій, магній, залізо, мікроелементи. Деяким продуцентів БАР в процесі біосинтезу потрібні вітаміни і регулятори росту [33].

Таблиця 2.1

Класифікація поживних середовищ

За консистенцією	За складом	За призначенням
напіврідкі		
рідкі	натуральні	універсальні
сипкі	синтетичні	селективні
тверді	напівсинтетичні	диференціально-діагностичні
сухі		

Для зростання автотрофних бактерій потреби в поживних речовинах досить прості: вода, двоокис вуглецю і відповідні неорганічні солі. Наприклад, бактерії роду

Nitrobacter асимілюють CO₂ і отримують енергію шляхом окислення нітритів в нітрати. Гетеротрофні бактерії використовують органічні з'єднання в двох цілях [45]: 1) в якості джерела енергії; при цьому органічна речовина окислюється або розщеплюється з вивільненням енергії і утворенням ряду кінцевих продуктів типу CO₂, органічних кислот і ін.; 2) в якості субстратів, асимільованих безпосередньо з утворенням клітинних компонентів або для їх синтезу в реакціях, що вимагають витрат енергії. Так, *E.coli* здатна до зростання на простому середовищі, що містить тільки глюкозу і неорганічні солі. Молочнокислі ж бактерії ростуть на складних середовищах, що містять в якості добавок ряд органічних з'єднань (вітаміни, амінокислоти та ін.), які клітини не в змозі синтезувати самостійно. такі сполуки називаються факторами росту [45].

За своїм призначенням поживні середовища діляться на діагностичні та виробничі.

Діагностичні поживні середовища призначені для виявлення, виділення та ідентифікації патогенних мікроорганізмів за морфологічними і фізіологічними ознаками. вони підрозділяються на елективні середовища, середовища для консервування, середовища збагачення і диференційно-діагностичні [43].

Елективні середовища служать для посіву тест-штаму для одержання чистої культури [42].

Середовища збагачення – накопичення однієї групи мікроорганізмів при одночасної затримки росту супутніх мікроорганізмів [42].

Диференційно-діагностичні середовища призначені для ідентифікації окремих видів мікроорганізмів з метою їх отримання [43].

До основних відносяться середовища, що застосовуються для вирощування багатьох бактерій. Наприклад, триптичного гідролізати рибних продуктів або казеїну, з яких готують рідке середовище (поживний бульйон) і щільне (поживний агар). До них відносять і м'ясопептонний агар (МПА), який застосовують для

культивування мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів і солодовий агар (СА) – застосовують для культивування дріжджів і цвілевих грибів. Такі середовища є основою для приготування більш складних поживних середовищ [45].

Виробничі середовища за складом можна розділити на дві групи: натуральні середовища (невизначеного складу) і синтетичні [40].

Натуральні середовища складаються з природних сполук, продуктів тваринного або рослинного походження. У них є всі необхідні компоненти для зростання і розвитку мікроорганізмів. Однак через складний невизначеним хімічним складом важко оцінити вплив окремих компонентів на механізм біосинтезу БАР. В промисловості натуральні середовища використовують для підтримки організмів, накопичення біомаси, діагностичних цілей [42].

Прикладами поживних середовищ такого типу є середовища, що представляють собою суміш продуктів розпаду білків (казеїну, м'язів ссавців), що утворюються при їх гідролізі. Кислотний (HCl) гідроліз білків використовується для приготування повних гідролізатів. Дія ферментів типу трипсину, панкреатину, папаїну приводить до неповного гідролізу білків, в результаті чого утворюються пептони. Як правило, на пептонно поживних середовищах мікроорганізми ростуть краще, ніж на поживних середовищах, приготованих з повних гідролізатів або сумішей амінокислот. При ферментативному гідролізі, ймовірно, зберігаються лабільні чинники зростання. Крім того, багато мікроорганізмів краще розмножуються на середовищах, що містять невеликі пептиди, тому що їх вони можуть засвоювати безпосередньо, а відсутні амінокислоти – немає [33].

До поживних середовищ невизначеного складу можна віднести і середовища, отримані на основі рослинної сировини: картопляний агар, томатний агар, відвари злаків, дріжджів, пивне сусло, настої сіна та ін. До числа середовищ невизначеного складу відносять і середовища напівсинтетичні. У таке середовище вносять відомі сполуки як явно необхідні; а також додають невелику кількість дріжджового або кукурудзяного екстракту. Основне ознаки таких поживних середовищ – виділення, культивування, отримання біомаси та підтримка культур мікроорганізмів [44].

Синтетичні середовища це середовища певного складу, представлені чистими хімічними сполуками, взятими в точно зазначених концентраціях і співвідношеннях окремих елементів. Обов'язковими компонентами таких середовищ є неорганічні солі і вуглець і азотовмісні речовини (типовими представниками є глюкоза і $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Часто до таких середовищ додають буферні розчини і хелатуючі з'єднання. Ауксотрофні організми ростуть на таких середовищах тільки при додаванні відповідних факторів росту. Основне призначення таких поживних середовищ – вивчення особливостей фізіології та метаболізму мікроорганізмів, виділення генетичних рекомбінантів і т.д [42].

2.1.4. Основне обладнання для біосинтезу мікроорганізмів *B. clausii*

Підготовку посівного матеріалу здійснюється у ферментаторах-інокуляторах, в яких нарощують посівний матеріал (рис. 2.2).

Інокулятори повинні відповідати наступним основним вимогам: простота конструкції, зручність та надійність експлуатації. Апарати мають об'єм 10, 5, 2 та 0,63 м³, діаметр від 0,9 до 2 м і частота обертання мішалки від 180 до 270 об/хв. Загальний обсяг ферментатора заповнюють на 70-80%, 20-30% обсягу заповнених газів (інертним - для анаеробів, повітрям – для аеробів) [9].

Мікроорганізм у вигляді суспензії подають з інокулятора у промисловий біореактор, або ферменер, в у якому міститься стерильне рідке поживне середовище. При цьому процес повинен виключати попадання сторонніх мікроорганізмів в поживне середовище разом із продуктом. Усі з'єднання систем повинні бути герметично закритими. Для проведення процесу в асептичних умовах необхідно введення додаткових стадій, що забезпечують стерилізацію поживного середовища і подаваного в ферменер повітря [44].

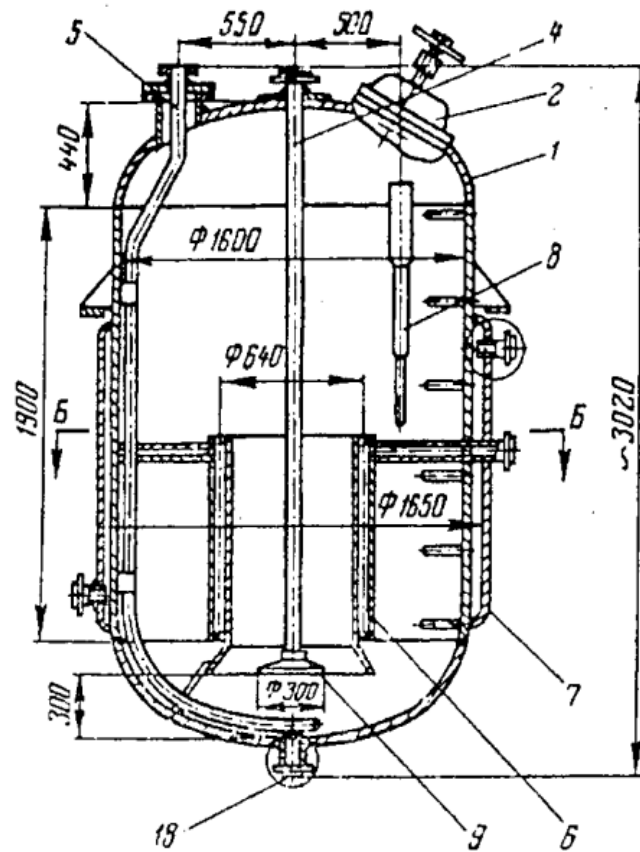


Рис. 2.2. Інокулятор: 1 – корпус; 2 – лаз; 3 – вікно; 4 – аератор; 5 – труба для подавання посівного матеріалу у ферментер; 6 – дифузор; 7 – сорочка; 8 – гільза для термометра; 9 – розетка аератору; 10-12 – штуцера для манометра, гільзи термометра і труби для передавання; 13-17 – штуцера для завантаження середовищ, аератора, виходу повітря, відбору проб і виходу води; 18 – штуцер для спускання рідини

Бактерії вирощують в однотипних реакторах і мають однотипну обв'язку: ферментер, стерильний багатокорпусний вентилятор для подачі поживного середовища, посівного матеріалу, підживлення та інше, систему регулювання рН, температури, піногасіння, системи контроль розходу повітря, пробовідбірник, електродвигун [3].

Конструкції ферментерів для культивування мікроорганізмів продуцентів БАР можна розділити на два типи: без підводки стерильного повітря (для анаеробів) і з підводкою стерильного повітря (для аеробів) [45].

Розміри ферментерів визначають співвідношення зовнішнього діаметра до висоти 1:2 до 1:6. Ферментери класифікують за способом введення в апарат енергії для переміщення: газової фази (ГФ), рідкої фази (РФ), газової і рідкої фази (ФГР).

Ферментатори періодичного дії з групи ФГР (рис.2.3) застосовують промисловості для отримання антибіотиків, вітаміни та інші біологічно активні речовини. Його конструкція забезпечує стерильність ферментації протягом тривалого часу при оптимальних умовах для росту і життєдіяльності продуцента [41].

Як видно з малюнку, це циліндричний вертикальний апарат із сферичним дном, оснащеним аератором, перемішувачем і теплообмінними пристроями. Повітря для аерації поступає в ферментер через барботер, встановлений під нижнім ярусом мішалки [10].

У якості циркуляційних пристроїв використовуються системи направляючих дифузорів. Теплообмінному пристрої виконані у вигляді трубок, встановлених в трубних решітках дифузорів. Його ємність 800 м (робочий об'єм 320 м³) розділена на 12 секцій [42].

Біосинтез цільового продукту у ферментері відбувається при заданому температурному режиму, аерації, перемішуванні та рН культуральної рідини; величину рН зазвичай регулюють періодичною подачею аміачної води через барботер ферментера [43].

Аерація рідини призводить до утворення піни, що знижує якість ферментації, тому використовують піногасники або механічні (установка у верхніх частинах ферментера спеціальної додаткової мішалки), або фізико-хімічне (використання для зниження поверхневого натягу на межі розділу фаз газ-рідина). Для підтримання постійності концентрацій окремих компонентів поживного середовища їх подають у вигляді стерильних розчинів за визначеною швидкістю та періодичністю у ферментер з спеціальних апаратів [40].

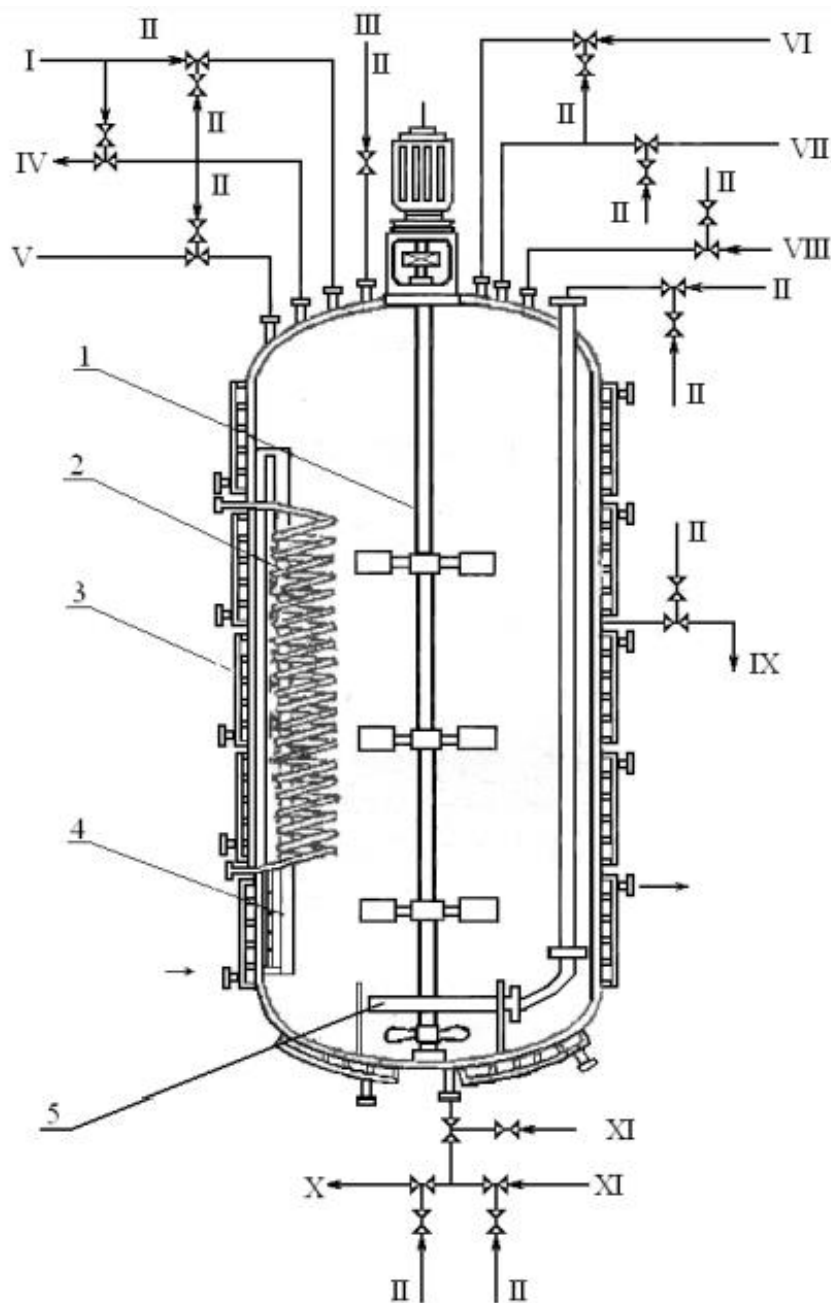


Рис. 2.3. Ферментер періодичного дії: 1 – мішалка, 2 – охолоджуючий змієвик, 3 – рубашка, 4 – перегородка, 5 – барботер, П-пар; I-XI – матеріальні та допоміжні трубопроводи (I – посилення, II – подача стерильного сжатого повітря, III – подача пара, IV – видалення відпрацьованого повітря, V – завантажувальна лінія, VI – лінія введення добавок, VII – подача піногасників, VIII – подача моючого розчину, IX – відбір проб, X – видача продукту, XI – спуск в каналізацію

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Методи виділення чистої культури *B. clausii*

Непрямий метод виділення чистих культур залишається досить поширеним способом отримання чистої культури. Він заснований на ізоляції однієї мікробної клітини від загального об'єму мікроорганізму та подальшому культивуванні цієї клітини у стерильних умовах [17].

Для посіву частіше використовуються агаризовані поживні середовища в чашках Петрі. Цей метод запропонований відомим німецьким мікробіологом Кохом і називається методом пластинчастих (або чашкових) культур Коха [16].

Метод засновано на розведенні концентрації мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі так, щоб на поживному середовищі вирости ізольовані колонії. Досліджуваний матеріал можна розвести двома способами [40]:

- перед висівом на щільне поживне середовище виконують попереднє розведення матеріалу в стерильній воді (фізіологічному розчині);
- посів розведеного матеріалу на щільне поживне середовища «методом виснажливого посіву» (рис. 2.4).



Рис. 2.4. Посів розведеного матеріалу на щільне поживне середовища «методом виснажливого посіву»

Метод Пастера (метод граничних розведень) полягає в тому, що з досліджуваного матеріалу роблять ряд послідовних розведень в рідкому живильному середовищі (рис. 2.5).

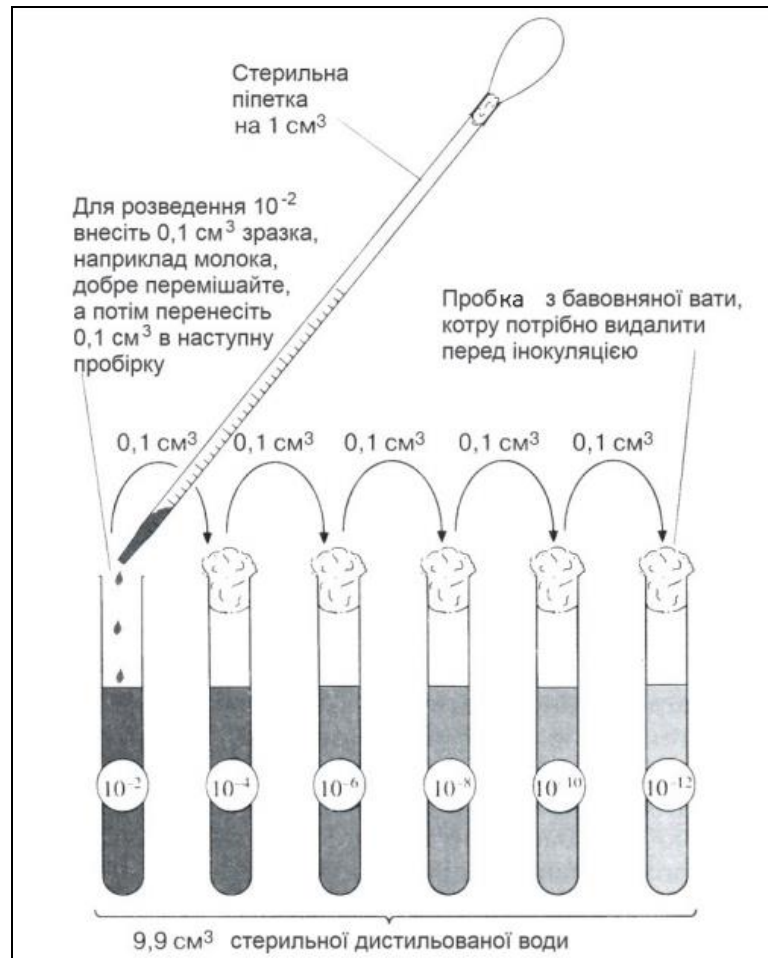


Рис. 2.5. Приготування серійних розведень

Для цього краплю посівного матеріалу вносять в пробірку зі стерильною рідким середовищем, з неї краплю переносять у наступну пробірку і так засівають до 8 пробірок. З кожним розведенням кількість мікробних клітин, що потрапляють в середовище, буде зменшуватися і можна отримати таке розведення, в якому у всій пробірці з середовищем буде знаходитися тільки одна мікробна клітина, з якої утвориться чиста культура мікроорганізму [17]. Так як в рідких середовищах мікроорганізми ростуть дифузно, тобто легко розподіляються по всьому середовищі, то ізолювати одну мікробну клітину від іншої важко. Таким чином, метод Пастера не завжди забезпечує отримання чистої культури. Тому в даний час цей метод використовується, головним чином, для попереднього зменшення концентрації мікроорганізмів в матеріалі перед посівом його в щільне середовище для одержання ізольованих колоній [17].

Метод Дригальського заснований на механічному розподілі мікробних клітин на поверхні щільного живильного середовища в чашках Петрі. Для посіву використовують декілька чашок Петрі, зі щільним поживним середовищем. На поверхню середовища вносять краплю досліджуваного матеріалу. Посів також проводять штрихом, використовуючи бактеріологічну петлю. Цією ж петлею здійснюють посів у інші чашки. У перших секторах спостерігається суцільний ріст, а уздовж наступних штрихів виростуть відокремлені колонії, що представляють собою потомство однієї клітини [17].

2.2.2. Методи культивування бактерії *B. clausii*

Культивування мікроорганізмів, крім складу живильного середовища, сильно залежить від фізичних і хімічних чинників (температури, кислотності, аерації, світла і т. д.). При цьому кількісні показники кожного з них неоднакові і визначаються особливостями метаболізму кожної групи бактерій [42].

Можна виділити методи культивування на твердих і в рідких поживних середовищах; в аеробних, анаеробних і мікроаерофільних умовах. Характеристики цього процесу встановлюють шляхом вимірювання таких показників як кількість клітин або їх біомаса [42].

У лабораторії мікроорганізми вирощують на щільних і рідких поживних середовищах, які розливають в пробірки, колби, матраци і чашки Петрі. Посуд і поживні середовища попередньо стерилізують різними методами. Внесення мікроорганізмів в стерильне середовище називається посівом [41].

Посів мікроорганізмів вимагає дотримання певних правил, які необхідно виконувати, щоб уберегти досліджувану культуру від забруднення сторонніми мікроорганізмами. Перед посівом слід зробити написи на посуді. Клітини мікроорганізмів для посіву або приготовані препарати беруть бактеріологічною петлею або голкою, якщо мікроорганізми вирощували на щільному середовищі. У разі, коли мікроорганізми вирощені в рідкому середовищі, краще користуватися піпеткою [7].

Культивування аеробних мікроорганізмів проводять наступним чином [17]:

– на поверхні щільних середовищ або в тонкому шарі рідких середовищ, коли мікроорганізми отримують кисень прямо з повітря;

– в рідких середовищах (глибинне культивування). В цьому випадку мікроорганізми використовують розчинений в середовищі кисень. Для забезпечення зростання аеробних бактерій в товщі середовища, потрібне постійне аерірованіє.

Поверхнєве культивування аеробів проводять на щільному або сипучому середовищі, а також у тонкому шарі рідкого середовища в скляному посуді із широким дном: чашках Петрі, колбах Виноградського, матрацах, кюветах [17].

Засіяні посудини культують при постійній температурі в термостатах або термостатних кімнатах (термокамерах). Мікроорганізми розвиваються на поверхні середовища й використовують кисень безпосередньо з повітря. На рідких середовищах облігатні аероби ростуть у вигляді рясних плівок. Факультативні аероби (анаероби) розвиваються як у товщі рідкого середовища, утворюючи суспензії, пластівці, осад, так і на поверхні у вигляді тонкої плівки. На щільних середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді окремих колонії або суцільного газону. Поверхнєве культивування широко застосовують для одержання накопичувальних і чистих культур, їх зберігання, вивчення морфологічних, культуральних і біохімічних ознак мікроорганізмів [17].

Простим і доступним способом періодичного глибинного культивування є вирощування аеробних культур у суспендованому стані в рідкому середовищі, розлитому в невеликих обсягах у пробірки або колби різної місткості, які після засівання поміщають на качалки в термокамери. Качалки забезпечують безперервне струшування або обертання посудин з частотою 100-300 об/хв. Ступінь аерації культуральної рідини регулюють зміною частоти обертання (струшування) качалки, обсягом середовища в посудинах і застосуванням спеціальних колб із 4-8 втисненими усередину відросткам – відбійниками для розбризкування рідини. Ефективність насичення середовища киснем при такому методі можна виміряти з певною погрішністю сульфїтним методом. Водяний розчин сульфїту, рівний обсягу поживного середовища поміщають у колби, аналогічні колбам, які

використовуються для культивування, ставлять на качалки й через певні проміжки часу вимірюють кількість окисленого сульфїту. Вирощування культур у колбах застосовують у лабораторній практиці для вивчення фізіологічних властивостей, установлення закономірностей їх росту залежно від складу компонентів середовища, з'ясування впливу факторів зовнішнього середовища; на життєдіяльність клітин, визначення продуктів метаболізму [17]. Безперервне глибинне культивування ведуть у лабораторних ферментерах (рис. 2.6).

В промисловості, при вирощуванні мікроорганізмів у ферментерах, досить часто разом із механічним перемішуванням використовують ще й продування через середовище стерильного кисню [42].



Рис. 2.6. Лабораторний ферментер для глибинного культивування аеробних мікроорганізмів

2.2.3. Методи визначення біомаси культури *B. clausii*

Для визначення інтенсивності росту мікроорганізмів у середовищах (природних субстратах) роблять висновки по зміні кількості біомаси в одиниці об'єму.

Методи визначення цих показників можуть бути прямими (підрахунок клітин під мікроскопом, зважування) або непрямими [17]. Непрямі методи засновані на вимірюванні параметрів, величина яких залежить від кількості або біомаси мікроорганізмів (число колоній, що вирости після посіву суспензії клітин на живильне середовище, розсіювання або поглинання суспензією світла, вміст у ній білка і т.д.). Вибір методу залежить від цілей дослідження, властивостей поживного середовища або субстрату, а також особливостей росту і морфології мікроорганізмів [17].

Біомасу культури *B. clausii* можна визначити ваговим методом. Його часто застосовують для оцінки росту мікроорганізмів у рідких поживних середовищах та щільних поживних середовищах. Якщо мікроорганізм був вирощений на щільному середовищі, то в цьому випадку необхідно попередньо ретельно змити колонії з поверхні середовища фізіологічним розчином або водою й перевести в суспензію [17].

Визначення біомаси складається із трьох послідовних операцій [17]:

- доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення;
- відокремлення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини;
- визначення їх маси.

Найчастіше визначають масу сухих клітин, хоча іноді можна обмежитися визначенням сирої біомаси. В останньому випадку перший етап відпадає; досить тільки зважити центрифужну пробірку (фільтр), але не доводити її масу до постійного значення. Біомасу зазвичай виражають у грамах або міліграмах на літр культуральної рідини [17].

Суху біомасу визначають за формулою [17]:

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

де M – суха біомаса в г/л;

A – маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

B – маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V – обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища й ретельністю зважування.

2.2.4. Визначення критеріїв оцінки процесу біосинтезу культури *B. clausii*

У будь-якому біотехнологічному процесі ключову роль відіграє біологічний агент, його природа і фізіолого-технологічні властивості. Для будь-якого біооб'єкту потрібен вихідний життєздатний посівний матеріал, джерела енергії та вуглецю, поживні речовини для синтезу біомаси, відсутність дії інгібіторів росту, відповідні фізико-хімічні умови ферментації (рН, температура, аерація та ін.). Одним з основних показників, що характеризують адекватність умов ферментації, служить швидкість росту продуцента [18].

Швидкість росту (збільшення біомаси) мікроорганізмів з бінарним поділом в поживному середовищі в періодичній культурі буде пропорційна концентрації мікробної біомаси [17]:

$$dX / dt = mX,$$

де dX / dt – швидкість росту, X – концентрація біомаси, m – коефіцієнт пропорційності («питома швидкість росту»). Якщо величина m постійна, як це буває в сталому режимі культивування, то інтегрування представленого рівняння має вигляд:

$$\ln X = \ln X_0 + m t,$$

де X_0 – біомаса в початковий період часу t .

Графік залежності $\ln X_0$ від часу буде мати вигляд прямої лінії з нахилом m . Питома швидкість росту є одним з основних параметрів, що характеризують фізіологічний стан продуцента; ряд інших параметрів може бути виражений через цей показник [15].

Продуктивність процесу характеризується кількістю продукту, одержуваного на одиницю об'єму біореактора в одиницю часу. Продуктивність процесу залежить

від багатьох факторів: активності продуцента, значень коефіцієнта виходу продукту з споживчого субстрату, кількості активної біомаси в ферментері [17]:

$$\Pi = q_s Y_p / s X \text{ [г/л - год]},$$

де q_s – швидкість споживання субстрату (метаболічний коефіцієнт), Y_p/S – вихід продукту (економічний коефіцієнт), X – концентрація біомаси, P – продукт, S – субстрат.

Впливати на величину продуктивності можна в результаті зміни різних її складових, але в кожному конкретному випадку це доводиться розглядати окремо. Так, при підвищенні величини X можуть виникнути обмеження по масообмінним характеристикам; впливати на величину метаболічного коефіцієнта культури можливо лише за умови глибокого значення взаємозв'язків між фізіолого-біохімічними характеристиками продуцента і умовами середовища [18].

Вихід продукту (Y) (економічний коефіцієнт) визначається як кількість продукту, одержуваного з даної кількості субстрату:

$$Y = X / (S_0 - S),$$

де S і S_0 – кінцева і початкова концентрація субстрату. Даний коефіцієнт виражає ефективність використання субстрату для отримання цільового продукту і є дуже важливою характеристикою, так як безпосередньо пов'язаний з продуктивністю і дозволяє впливати на собівартість кінцевого продукту.

Економічний коефіцієнт має чіткий фізичний зміст, що характеризує ступінь переходу енергії, укладеної в субстраті, в продукт. Дана величина для розрахунків і прогнозування процесу в цілому використовується як параметр для контролю і управління ходом різних процесів і зіставлення їх ефективності [42].

Кінцева концентрація продукту повинна плануватися з урахуванням тривалості процесу і величини виходу продукту. Досягнення кінцевої високої концентрації продукту відбувається після трудомістких і дорогих етапів постферментаційної стадії (виділення, концентрування) [41].

Питомі енерговитрати істотно варіюють в залежності від спрямованості і схеми процесу ферментації, а також умов підготовки сировини на предферментаційній стадії і від постферментаційних процедур. Питомі

енерговитрати дуже істотно також залежать від типу ферментаційного обладнання [18].

Непродуктивні витрати субстрату (h) – витрати енергії субстрату, які не виявляються в прирості продукту. У загальному вигляді вони виражаються через економічний коефіцієнт [18]:

$$h \frac{Y_{\text{експериментальний}}}{Y_{\text{теоретичний}}} \leq 1$$

Непродуктивні витрати істотно впливають на ефективність і економіку біотехнологічного процесу, тому виявлення причин і місць додаткових витрат енергетичного субстрату дуже важливо. Непродуктивні витрати субстрату можуть бути пов'язані з помилками при зчитуванні генетичної інформації в ході швидкого зростання продуцента і через зростання витрат енергії на підтримку життя без розмноження (транспорт субстратів і мономерів в клітині, захисні реакції, процеси репарації) [17].

Первинна оцінка ефективності біотехнологічних процесів по перерахованих параметрах проводиться на стадії лабораторних розробок і випробувань процесу і далі уточнюється при масштабуванні на дослідно-промислових стадіях [18].

2.2.5. Методи кількісного підрахунку бактерій *B. clausii*

Даний метод надає можливість визначити лише число життєздатних клітин в популяції. Оскільки середовищ, придатних для росту всіх мікроорганізмів, не існує, метод висіву дає можливість визначити лише число мікроорганізмів, здатних рости на середовищі певного складу [17].

В основі методу лежить принцип Коха, згідно з яким кожна колонія є потомством однієї клітини [17]. Це дозволяє на підставі числа колоній, які вирости після посіву на щільне ЖС (живильне середовище) певного обсягу досліджуваної суспензії, судити про вихідний вміст в ній клітин мікроорганізмів. Результати кількісного обліку мікроорганізмів, проведеного методом Коха, часто виражають не

в числі клітин, а в умовних одиницях – так званих колонієутворюючих одиницях (КУО) [17].

Визначення числа мікроорганізмів цим методом включає три етапи (рис. 2.7):

- приготування розведень;
- посів на щільне середовище в чашки Петрі;
- підрахунок вирослих колоній.

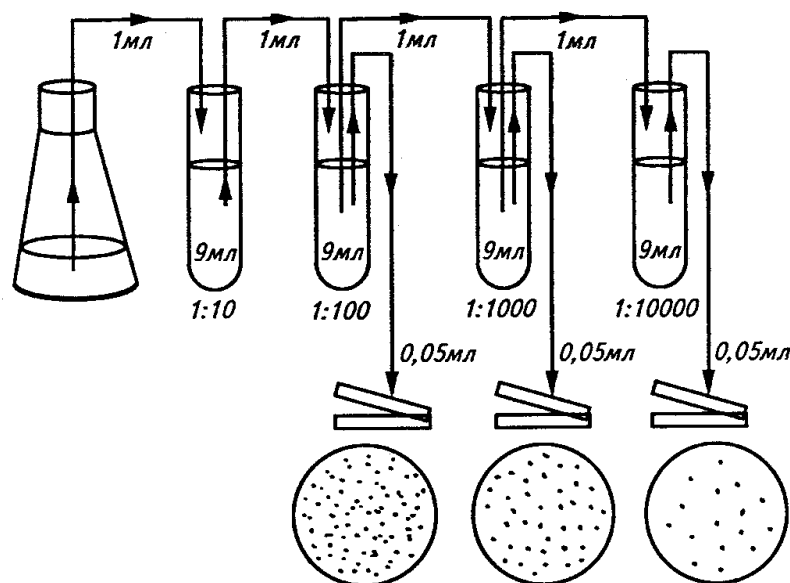


Рис. 2.7. Приготування послідовних розведень

Результати враховують на тих чашках Петрі, на яких виростає від 30 (50) до 100 (150) колоній. Якщо число вирослих колоній виявилось менше 10, то ці результати для розрахунку кількості клітин у вихідному матеріалі не використовують [17].

Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = a \times 10^n / V$$

де M – кількість клітин в 1 мл;

a – середнє число колоній на чашці Петрі;

V – об'єм суспензії, взятий для посіву, мл;

10^n – коефіцієнт розведення.

2.3. Висновки до розділу

Отже, в розділі описано метод отримання чистої культури, та шляхи ідентифікації мікроорганізму: мікроскопія та фарбування за грамом. Надано характеристику поживним середовищем, які використовують для культивування мікроорганізмів. Описано основну апаратуру для біосинтезу.

РОЗДІЛ 3

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ НА ПРОЦЕС БІОСИНТЕЗУ КУЛЬТУРИ *BACILLUS CLAUSII*

Для проведення експериментальної частини дипломної роботи використовувалася культура спор *B. clausii*, яку отримали з препарату «Ентерожерміна». Робота проводилася за схемою (3.1):

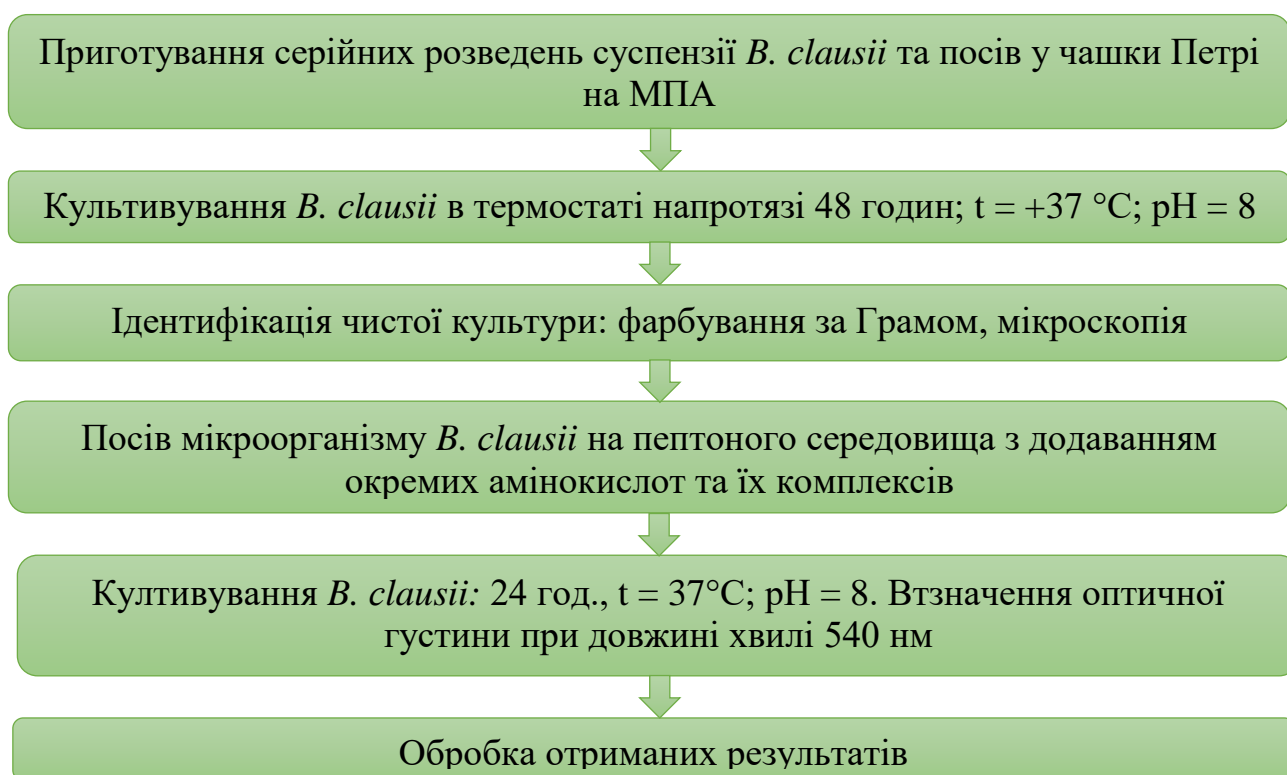


Рис. 3.1. Етапи експериментальних досліджень

3.1. Виділення чистої культури *B. clausii*

Для проведення експериментальної частини дипломної роботи використовувалася культура спор *B. clausii*, яку отримали з препарату «Ентерожерміна». Для отримання ізольованої мікробної клітини був використаний

метод Пастера. Суть роботи полягала в тому, щоб зробити ряд послідовних розведень в стерильній воді.

До початку роботи було підготовлено 6 стерильних пробірок. В кожену пробірку додано 9.9 мл. стерильної води. Стерильною піпеткою на 1 мл. відбираємо 0,1 мл. и вносимо в першу пробірку. Ретельно перемішуємо і з першої пробірки знову відбираємо 0,1 мл.. Цю ж саму маніпуляцію повторюємо з іншими пробірками. В результаті у 8й пробірці ми вже отримуємо розведення у ступені 10^{-12} . З кожним кроком розведення кількість спор *B. clausii* зменшується і можна отримати таке розведення, коли у всій пробірці знаходиться лише одна спор *B. clausii*.

Метод Пастера був використаний лише для попереднього зменшення концентрації спор *B. clausii*, перед посівом на м'ясо-пептонний агар (МПА) для отримання ізолюваних колоній.

Посів на МПА для отримання ізолюваних колоній проводився за методом Пастера. Для цього етапу використовувалися три чашки Петрі, залиті щільним поживним середовищем МПА. На поверхню першої чашки Петрі вносили краплю з пробірки з найбільшим розведенням. За допомогою стерильного шпателя розподіляли краплю досліджуваного матеріалу по всій поверхні поживного середовища (посів газоном). У другу та третю чашку посів здійснюють цим же шпателем [17].

Далі чашки Петрі помістили в термостат за температури 37 °C для культивування на 2 доби.

Після двох днів культивування проводилася оцінка посіву. У першій чашці спостерігався суцільний ріст і злиті колонії. В другій чашці колонії росли вже не таким суцільним шаром. В третій чашці вже утворилися ізолювані колонії, з яких і виділяли чисту культуру. З ізолюваних колоній були приготовані фіксовані мазки для подальшого фарбування за Грамом.

Технологія фіксації мазка фізичним методом використовують для закріплення висушеного на склі матеріалу висушений мазок піддають фізичній фіксації. Під час короткотривалої дії високої температури відбувається коагуляція білка, що і сприяє

прикріпленню препарату до скла. При фіксації мазок більш надійно закріплюється до поверхні скла, тому при подальшому фарбуванні препарату мікробні клітини не змиваються [17].

Для проведення фіксації під час дослідження було використано: пінцет, посуд для фіксації, штатив для сушки мазків на повітрі, спиртівка, предметне скло.

Тримаючи за ребра предметне скло пальцями правої руки плавним рухом проводимо 2 рази над верхньою частиною полум'я пальника. Процес фіксації тривав лише 2 секунди (рис. 3.2). Щоб перевірити правильність виконання фіксації: сторону препарату, яка вільна від мазка, прикладали до тильної сторони кисті. Скло було гаряче, але не викликало відчуття опіку – це свідчить про надійність фіксації [17].

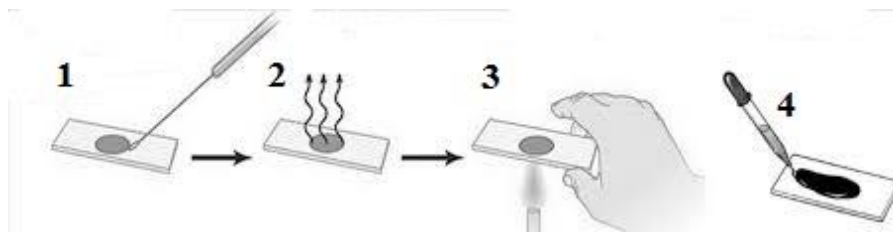


Рис. 3.2. Етапи приготування фіксованого мазка:

- 1 – нанесення мікроорганізмів на предметне скло; 2 – висушування;
3 – фіксація; 4 – фарбування

Метод фарбування за Грамом використовувався як діагностичний метод, оскільки бактерії *B. clausii* є грам-позитивними. Здатність фарбуватися в певний колір залежить від будови клітинної стінки і співвідноситься з багатьма іншими властивостями бактерій. У грам-позитивних бактерій в складі клітинної стінки відсутні ароматичні та сірковмісні амінокислоти, а також низький вміст ліпідів, велика кількість магнієва сіль рибонуклеїнової кислоти. Саме через цю сіль і утворюється хімічний комплекс с білком, генціанвіолетом і йодом, який не руйнується при короткочасній дії спирту [17].

Для проведення фарбування за Грамом на фіксований мазок через фільтрувальний папір наносили розчин основного фарбника (гінціанвіолет) на 2

хвилини. Далі препарат промивали водою. Після цього наносили розчин Люголя на 1 хвилину, який водою вже не промивали. Наступним етапом було нанесення 96% етанолу на 30-60 секунд, з подальшим промиванням водою. Висушивши препарат фільтрувальним папером, проводилася мікроскопія з імерсійною системою [17].

3.2. Морфолого-культуральні ознаки виділеної культури *B. clausii*

Після культивування в термостаті ізольовані колонії було оглянуто і описано. Спостерігались середні і великі колонії (рис. 3.3). Діаметр колоній становив від 4 мм. до 6 мм., правильної форми з плоским рельєфом. Колонії округлої форми мали сірувато-білий колір, матовий, з нерівними краями. В центрі колонії можна відмітити ущільнення. Колонії сухі і не проростають в агар, тому їх легко відділити.

Морфологія клітин *B. clausii* – паличкоподібний аеробний (факультативний) грам-позитивний мікроорганізм (рис. 3.4), оточений товстою клітинною стінкою. Клітинна стінка складається з мурієну пептидоглікану. Клітини *B. clausii*, як правило, шикуються в ланцюгоподібні утворення, що спостерігаються як довга паличка. Розміри клітини становлять 0,7–0,9 на 2,5–5,0 мкм. *B. clausii* продукує ендоспору (рис. 3.5), створює еліпсоїдну спору, розташовану субтермінально або парацентрально в спорангію. Спори стійкі до багатьох антибіотиків [10].

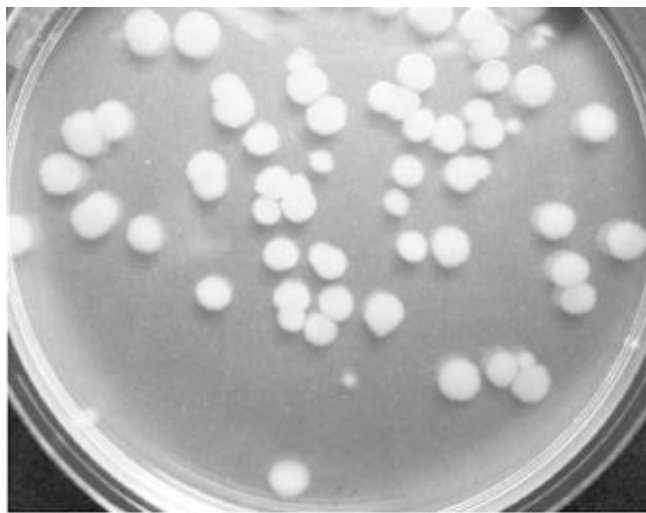


Рис. 3.3. Колонії утворені бактерією *B. clausii*



Рис. 3.4. Клітини *B. clausii* пофарбовані за Грамом, х900

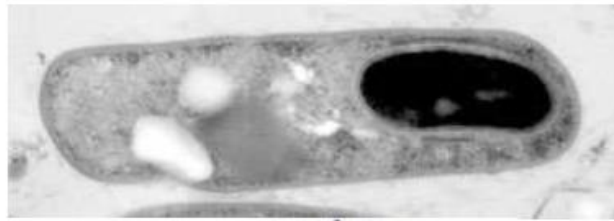


Рис. 3.5. Ендоспори в клітинах *B. clausii*, х1300

На всій поверхні клітини наявні джгутики (рис.3.6). Вони мають розмір 2-3 мікрона в довжину і 1 мікрон в ширину. У агарових культурах зустрічаються круглі колонії, діаметр яких може бути близько 3-4 мм. З генетичної точки зору *B. clausii* володіє єдиною круговою хромосомою. При цьому міститься 4204 гена, з яких 4096 кодують експресію певних білків.

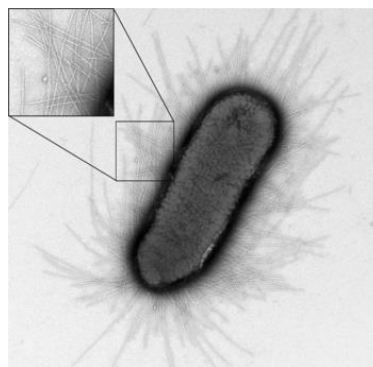


Рис. 3.6. Джгутики клітин *B. clausii*, х1300

За використання бактерій роду *Bacillus* розроблені і успішно застосовуються на практиці ряд ефективних пробіотиків [4]. Властивості пробіотиків визначаються за біологічними властивостями продуцентів, які використовуються. Головні властивості *Bacillus* – це висока антимікробна активність, обумовлена синтезом антибіотиків та літичних ферментів.

Bacillus синтезують літичні ензими, такі як лізин, а також комплекс ферментів: глюкоза, манноза, протеаза, і інші ферменти, що здатні руйнувати Гр- мікроорганізми [19].

Одним з головним напрямком застосування літичних ферментів являється їх використання в якості антимікробних препаратів в медицині для боротьби з патогенами мікроорганізмами, стійкими до традиційними препаратами [19].

Пробіотичні препарати на основі бактерій роду *Bacillus* починають діяти в момент потрапляння в травний канал. Дані пробіотики є суспензіями спорових форм мікроорганізмів. Після потрапляння в травний канал бактерії під дією секрету слизистих оболонок і шлунку, та починають інтенсивно проростати.

3.3. Процес біосинтезу бактерії *B. clausii*

Отриману чисту культуру спороутворювальних бактерій *B. clausii* з препарату «Ентерожерміна» використовували у подальших дослідках. Для того щоб дослідити вплив обраних факторів росту і накопичення біомаси було обрано основне середовище для культивування в якому в ході експерименту змінювали певні складові.

При підборі оптимального середовища культивування бактерій в якості такого було обрано пептонове середовищі. Оптимальна температура для культивування дорівнює 37 °С. Найбільш інтенсивний ріст мікроорганізму спостерігається при рН 8,0.

Критерієм оптимального складу середовища слугує показник життєздатних клітин. Титр життєздатних клітин визначалася шляхом висіву граничних розведень на МПА з подальшим підрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО).

Визначення впливу температури на ріст *B. clausii*. Культивування проводили на пептонове середовищі (таб. 3.1). Пептоне середовище включає (г/л): пептон –

10,0; MgSO₄·7H₂O – 0.5; NaCl – 3,0; глюкоза – 5,0; агар-агар – 15; дистильована вода – 1 л.

Культивування проводили на протязі 48 годин за різних температур: -5 °С; +15 °С; +20 °С; +35 °С; +40 °С; +55 °С. при рН середовища 8. Визначення впливу температури на мікроорганізм оцінювали за наявності чи відсутності росту колоній.

Таблиця 3.1

Вплив температури на біосинтез бактерій *Bacillus clausii*

Показники температури, °С	Наявність росту колоній
-5	відсутній колонії
+15	відсутній колонії
+20	наявні колонії
+35	наявні колонії
+40	наявні колонії
+55	відсутній колонії

Як видно з даних таблиці мікроорганізм *B. clausii* може розвиватися за температури від +20 °С до +40 °С, та найбільш інтенсивний ріст спостерігався за температури +35 °С.

Визначення впливу концентрації NaCl. Для визначення впливу NaCl на ріст спороутворювальних бактерій *B. clausii* здійснювався посів культури на пептоне середовище в якому було змінено концентрацію солі. Для досліду обрали таку концентрацію NaCl (г/л): 3, 5, 7, 10 (таб. 3.2). Культивували у термостаті за температури 37 °С протягом 48 годин при рН 8,0 з подальшим підрахунком КУО (таб. 3.3).

Згідно даних, які наведено в таблиці 3.3 робимо висновок, що найбільш інтенсивний ріст спостерігається при концентрації NaCl 3 г/л. – КУО становить 187. Далі зі збільшенням концентрації NaCl показник КУО знижувався: 5 г/л. = 163 КУО;

7 г/л. = 93 КУО; 10 г/л. = 35 г/л. Здатність культури розвиватися при концентрації NaCl 10 г/л. свідчить про її стійкість до солей.

Таблиця 3.2

Склад середовища для культивування *Bacillus clausii*

Компонент поживного середовища	Кількість речовини, г/л			
	Пептон	10	10	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl	3	5	7	10
Глюкоза	5,0	5,0	5,0	5,0
Агар-агар	15	15	15	15
Дистильована вода	до 1 л	до 1 л	до 1 л	до 1 л

Таблиця 3.3

Вплив концентрації NaCl на процес біосинтезу культури *Bacillus clausii*

Кількість NaCl, г/л	КУО/г · 10 ⁻⁶
3	187
5	163
7	93
10	35

Визначення впливу рН. Для визначення впливу рН на ріст спороутворювальних бактерій *B. clausii* здійснювався посів культури на пептононому середовищі в якому було змінено значення рН. Для корекції рН пептононого середовища додавали HCl. Показники рН пептононого середовища становили: 4,0; 5,0;

6,0; 8,0; 9,0. Культивували у термостаті за температури 37 °С протягом 48 годин при з подальшим підрахунком КУО (таб. 3.4).

Таблиця 3.4

Вплив рН на процес культивування *B. clausii*

Значення рН	КУО/г 10 ⁻⁶
4,0	Відсутні
5,0	Відсутні
6,0	17
8,0	193
9,0	175

3.4. Кількісний підрахунок бактерій *B. clausii*

Щоб здійснити кількісний підрахунок, мікроорганізм *B. clausii* висівали на поверхні МПА. До початку посіву в чашки Петрі розливають поживне середовище МПА в об'ємі від 15 мл до 20 мл. Для того, щоб середовище застигло рівномірно, чашки Петрі залишають на горизонтальній поверхні. Коли поживне агаризоване середовище застигло, стерильною піпеткою вносимо суспензію мікроорганізму. Розподіливши суспензію на поверхні МПА, потрібно залишити чашки Петрі при кімнатній температурі приблизно на 30 хвилин [17].

Культивування відбувалося у термостаті 48 годин за температури 37 °С, рН 8. Підрахунок колоній проводили за умови закритих чашок Петрі. Для прискорення процесу кожен врахований колонію позначали крапкою (рис. 3.7). За умови великої кількості колоній, зовнішнє дно чашки Петрі можна поділити на сектори і підрахувати колонії окремо на кожному з них, а потім підсумувати [17].

Результати обиралися лише в тому випадку, якщо на чашка утворювалося від 30 до 150 колоній. Якщо кількість колоній виявлялася менше, то дані не використовувалися.



Рис. 3.7. Колонії культури *B. clausii*

3.5. Вплив стимуляторів росту на процес накопичення культури *B. clausii*

Біологічна активність мікроорганізмів та синтез метаболітів як правило пов'язані з умовами культивування та складом середовища. Тому було досліджено вплив факторів росту на динаміку росту та зміну активності літичних ферментів.

Для вивчення впливу стимуляторів росту на біосинтез бактерії *B. clausii* як приклад факторів росту були обрані амінокислоти, а саме: аргінін, аланін, триптофан, гістидин, фенілаланін, гліцин, валін, цистеїн та метіонін. Амінокислота додавали в об'ємі 0,03 мг. Культивування проводили на пептоновому середовищі в термостаті, протягом 24 годин.

Для визначити активність літичних ферментів, які продукують клітини *B. clausii* використовували формулу:

$$\frac{OD_{\text{вих}} - OD \cdot OD_{\text{вих}} - OD}{OD_{\text{вих}} \cdot OD_{\text{вих}}} \times 100\%$$

де $OD_{\text{вих}}$ – оптична густина до культивування;

OD – оптична густина після культивування.

Визначення літичної активності бактерії *B. clausii* проводили за допомогою мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

Мікроорганізмів були культивувалися на поживному середовищі МПА протягом 24 годин. Клітини змивали 0,1 М розчинному буферу рН 7,0.

До 2 мл відцентрифугованої від клітин культуральної рідини бактерій *B. clausii* додавали 2 мл. суспензії мікроорганізмів *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. Інкубували на протязі 60 хвилин, за температури 41 °С. Оптичну густину оцінювали при довженні хвилі 540 нм.

Під час культивування бактерій *B. clausii* на поживному середовищі без додавання амінокислот (рис. 3.8) було виявлено що літичні ферменти синтезуються в основному в логарифмічній фазі що відповідає 24 годинам культивування. Зі збільшенням біомаси збільшується і продукція літичних ферментів.

Таблиця 3.5

Реєстрація накопичення біомаси за допомогою КФК-2 при 540 нм

t, час	0	12	24	36	48
Оптичн густина, од.	0,098	0,168	0,213	0,159	0,131

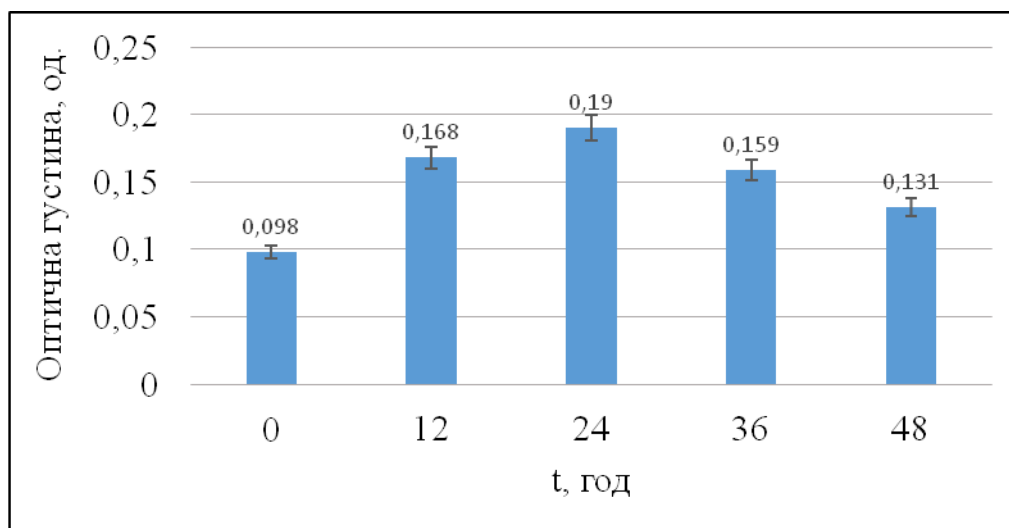


Рис. 3.8. Динаміка накопичення біомаси *B. clausii* при температурі 37 °С

Максимальна активність ферментів спостерігається в кінці логарифмічній фазі росту. При цьому лізіс клітин *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* становить 5%, 23% та

34% відповідно (рис. 3.9). При подальшому культивуванні спостерігалась закономірність зменшення активності літичних ферментів зі зменшенням біомаси продуцентів.

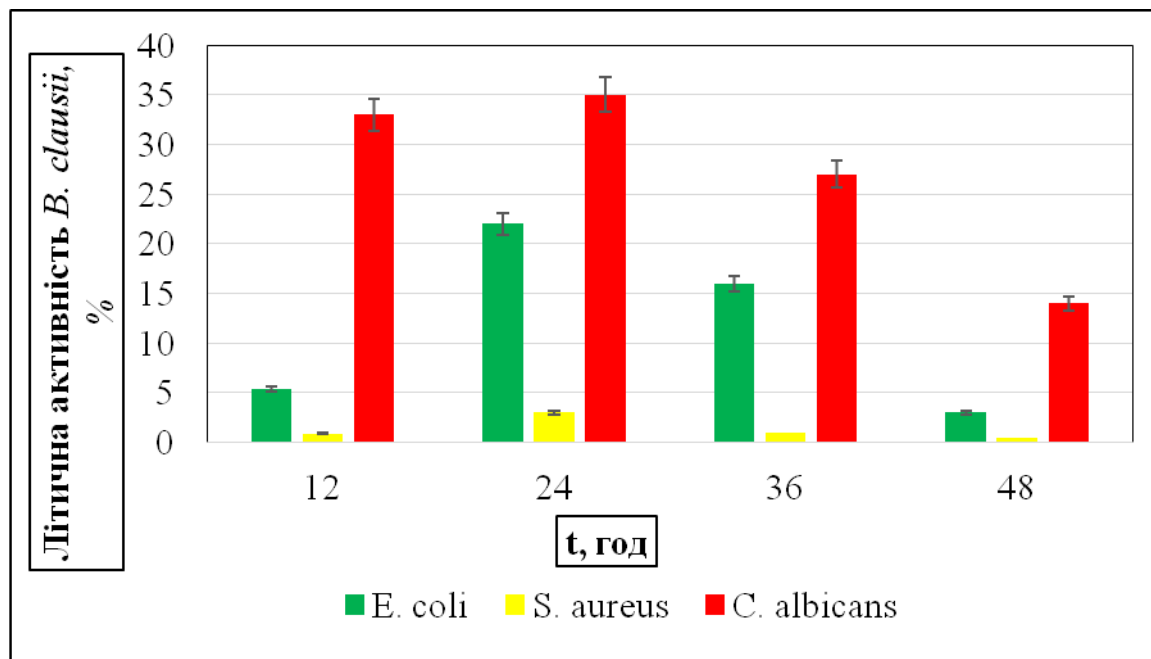


Рис. 3.9. Динаміка літичної активності (%) *Bacillus clausii* по відношенню до тест-культур при температурі 37 °С

Бактерії роду *Staphylococcus* виявилися майже не чутливі до дії ферментів даного продуценту. Оскільки руйнування клітинних стінок тест-культур і в наслідок лізису самих клітин відбувається під дією різних ферментів відбувається під дією різних ферментів, можна допустити, що спороутворювальний мікроорганізм *B. clausii* продукують комплекс різних літичних ферментів.

Щоб з'ясувати, як впливають здійснюють амінокислоти на активність літичних ферментів, до поживного середовища додавали як окремі, так і комплекси. Як видно з результату дослідження, окремі амінокислоти по-різному впливають на активність ферментів (рис. 3.10).

З рисунку 3.10 видно що аргінін, аланін, триптофан, гістидин і фенілаланін збільшують літичну активність ферментів по відношенню до клітин *E. coli* на 34,8 – 55,3 %, по відношенню до *S. aureus* на 33,3 – 76,7%, по відношенню до *C. albicans* змін не

спостерігалось. Гліцин, валін, цистеїн та метіонін знижували літичну активність по відношенню до *E. coli*, *C. albicans* і *S. aureus* на 52,20 – 65,2%, 35,3 – 82,4% і 33,3 – 33,5%, в порівнянні з контролем.

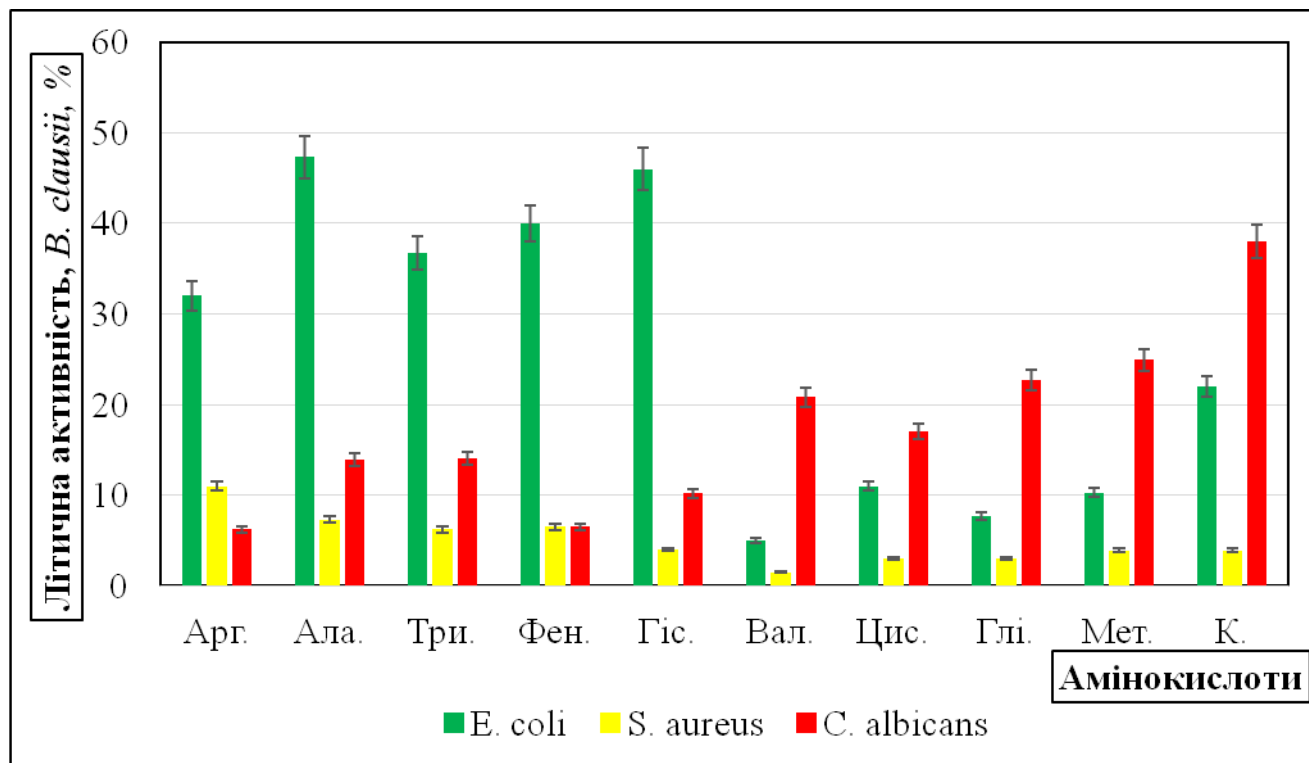


Рис. 3.10. Зміна літичної активності *B. clausii* при додаванні окремих амінокислот в середовище культивування при температурі 37 °С

В разі додавання в поживне середовище культивування комплексу амінокислот (I – комплекс амінокислот: аргінін, аланін, триптофан; II – комплекс амінокислот: фенілаланін, гістидин, валін; III – комплекс амінокислот: цистеїн, гліцин, метіоніну) помітно збільшувалась активність лише грам-негативних бактерій (рис. 3.11). Руйнування клітин грам-позитивних і дріжджів знижувалося порівняно з контролем.

Судячи з отриманих експериментальних даних видно, що амінокислоти мають вагомий вплив в регулюванні активності літичних ферментів у пробіотичному штамі *B. clausii*. Саме тому можна привести припущення, що синтез ферментів стимулюється окремими амінокислотами. Це дає можливість покращувати ріст і літичну активність досліджуваного мікроорганізму по відношенню до клітин грам-негативних бактерій за допомогою додавання комплексів. Та більш ефективним є додавання окремі амінокислоти такі як аргінін, аланін, триптофан, гістидин і

фенілаланін. Ці амінокислоти стимулюють накопичення біомаси та підвищують активність літичних ферментів. При цьому руйнування клітинних стінок *E. coli* збільшилось на на 30-100%, а *S. aureus* в 2,3 – 4 рази. Гліцин, хоч і сприяє росту бактерій, але затримує синтез ферментів. Цистеїн і метіонін знижують активність накопичення біомаси, і зменшують активність літичних ферментів мікроорганізму *B. clausii*.

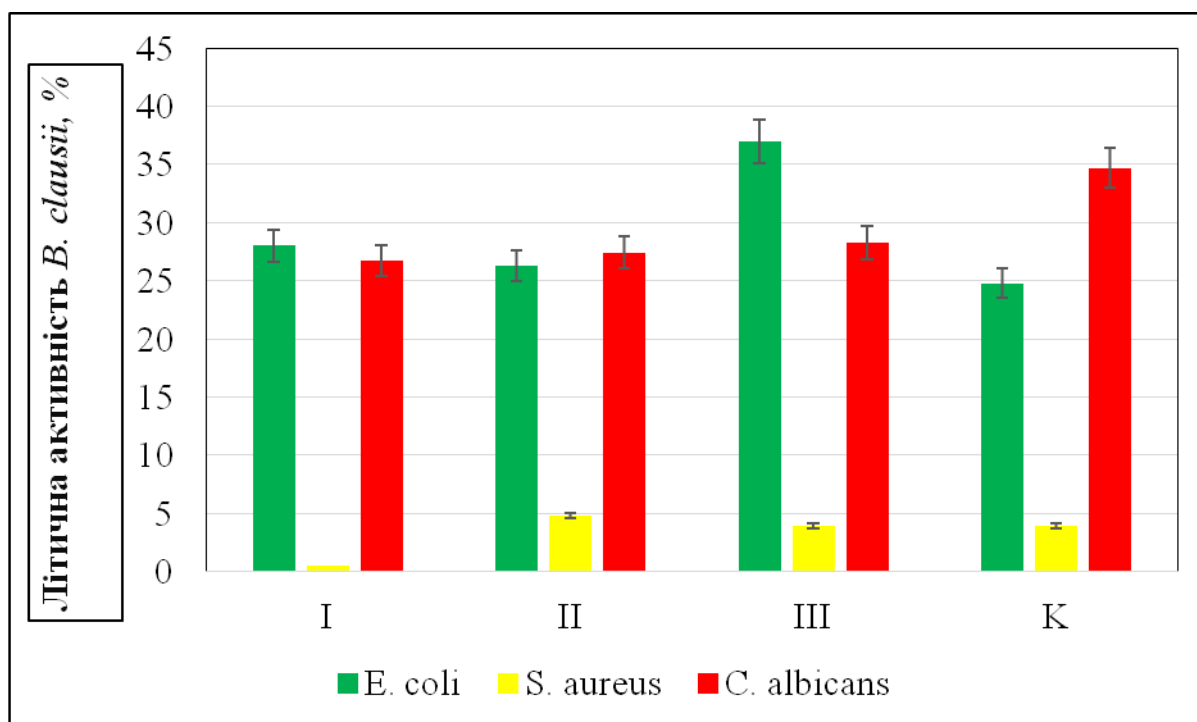


Рис. 3.11. Вплив комплексу активних амінокислот на активність літичних ферментів у *Bacillus clausii* при температурі 37 °С

3.5. Технологічна схема одержання пробіотика «Ентерожерміна»

Препарат «Ентерожерміна» заслуговує на особливу увагу. Він успішно застосовується для лікування кишкових інфекцій, які викликані умовно-патогенною та патогенною мікрофлорою, діареї, а також для профілактики розвитку дизбактеріозу. Ентерожерміна містить у своєму складі спори штамів *B. clausii* (N/R, O/C, SIN і T).

Виробництво пробіотиків здійснюється в окремих приміщеннях, де не проводять роботу з патогенними мікроорганізмами і антибіотиками та дотримуються вимог захисних

зон, відповідно діючим санітарним правилам. Обов'язково

процесу виробництва пробіотиків є дотримання при



Рис. 3.12. Технологічна схема одержання пробіотика Ентерожерміна

3.6. Висновки до розділу

Отже, аргінін, аланін, триптофан, гістидин і фенілаланін збільшують літичну активність ферментів по відношенню до клітин *E. coli* на 34,8 – 55,3 %, по відношенню до *S. aureus* на 33,3 – 76,7%, по відношенню до *C. albicans* змін не спостерігалось. Гліцин, валін, цистеїн та метіонін знижували літичну активність по відношенню до *E. coli*, *C. albicans* і *S. aureus* на 52,20 – 65,2%, 35,3 – 82,4% і 33,3 – 33,5%, в порівнянні з контролем. Визначено, що гліцин, цистеїн та метіонін знижують літичну активність 33,3 – 65,2 %. Тому їх застосування як фактори росту – не рекомендовано.

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при дослідженні впливу стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів

Аналізуючи технології досліджень, що використовувалися під час проведення дипломної роботи у лабораторії кафедри біотехнології ФЕБІТ НАУ можна виокремити шкідливі чинники, які впливають на самопочуття і працездатність людини. За ГОСТ 12.0.003-74 на працівника під час знаходження в лабораторії діяли фізичні та хімічні небезпечні виробничі фактори [20].

Фізичні небезпечні і шкідливі виробничі фактори поділяються на такі:

- 1) підвищена температура повітря робочої зони;
- 2) підвищений рівень шуму на робочому місці;
- 3) підвищений рівень ультрафіолетової радіації [20].

Хімічні небезпечні та шкідливі виробничі фактори поділяються за характером впливу на організм людини на: токсичні; подразнюючі; сенсibiliзуючі; канцерогенні; мутагенні; такі що впливають впливають на репродуктивну функцію [20].

Підвищена температура повітря робочої зони. При недостатній теплоізоляції нагрітих поверхонь апаратів і комунікаційних теплових мереж можлива дія на працівника одночасно з хімічним чинником і підвищення температури повітря. Підвищена температура головна проблема в сушильних відділеннях, біля таких апаратів: термостати, автоклави, дистилятори та електричні плитки. В теплу пору року температура повітря на цих ділянках може сягати від 34 °С до 38 °С при відносній вологості від 40 % до 60 % [21].

Підвищений рівень шуму на робочому місці. Джерелом виробничого шуму в лабораторії є багато технологічних апаратів. До них відносяться шафа сушильна електрична СШ-30, центрифуги, термостат електричний сухоповітряний ТС-80М, дробарки, вентилятори, холодильник побутовий та ін. Згідно з ДСН 3.3.6.037-99 показники допустимого рівня для приміщення лабораторії становить 50дБА [22]. Під час виконання дослідів рівень шуму в лабораторії дорівнював 57,8 дБА, що є перевищенням норм [23].

Підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Певні етапи роботи вимагають повної стерильності. Ці процеси проводились в ламінарних боксах, де стерильність приміщення досягається ультрафіолетові стерилізатори. Допустимі значення густини УФ-променів для діапазону 220-280 нм становлять 0,01 Вт/м² [23].

Хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори. Під час проведення дослідів в лабораторії були присутні певні хімічні фактори: етиловий спирт, аміачний розчин. Етиловий спирт відносять до 4-го класу безпеки. За ГОСТ 12.1.005-88 ГДК етилового спирту становить 5 мг/м³ [24]. Цю хімічну речовину в ході проведення лабораторних дослідів використовували як засіб для дезінфекції інструментів та робочої поверхні. Аміачний розчин відносять до 4-го класу безпеки. За ГОСТ 12.1.005-88 ГДК аміачного розчину становить 20 мг/м³ [24]. Аміачний розчин використовується в досліді як буферний розчин для регулювання рН поживного середовища.

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при дослідженні впливу стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів

Для зменшення негативного фактор небезпечних та шкідливих факторів при роботі у лабораторії кафедри біотехнології ФЕБІТ НАУ були вжиті певні заходи. При дотриманні цих правил можна знизити рівень впливу факторів, які можуть погіршувати продуктивність праці і здоров'я працівників.

Зменшення рівня впливу підвищеної температури повітря робочої зоно. Допустимі параметри температурного режиму формуються за допомогою раціонального формування приміщення. У лабораторії знаходяться в окремих боксах прилади, які спричиняють підвищення температури [22].

У виробничих приміщеннях з надлишком тепла використовують природну вентиляцію. Аераційні шахти розташовані безпосередньо над джерелом тепла на одній осі. У боксах де одиничні джерела тепловиділення оснащують обладнання місцевою витяжною вентиляцією [21].

У випадку, коли неможливо технічним засобами забезпечити допустимі гігієнічні норми на робочих місцях використовують індивідуальні засоби захисти:

– для захисту рук від опіків потрібно використовувати спеціальні рукавички, прихватки [24];

– для захисту очей та обличчя: захисні окуляри, захисні маски [24].

В теплу пору року рекомендується проводити профілактику порушень водно-сольового балансу шляхом компенсації рідини, солей (натрій, калій, кальцій та ін.), мікроелементів (магній, мідь, цинк, йод та ін.), розчинних в рідині вітамінів, які виділяються з організму потом [24].

Зменшення впливу підвищення рівня шуму на робочому місці. Захист від шуму в лабораторії досягається шляхом створення шумобезпечної техніки (ДСН 3.3.6.0037-99), застосування методів і засобів колективного захисту (ГОСТ 12.1.029 - 80), індивідуального захисту, використання архітектурно -планувальних методів [25].

В приміщенні, де знаходиться лабораторія створені колективні засоби захисту. В свою чергу вони, розподіляються на такі, що знижують шум у джерелі його виникнення, і такі, що сприяють зниженню шуму під час його поширення. Перші з них найбільш ефективні та економічні. Вони спрямовані на зменшення шуму вібраційного (механічного), аеродинамічного та електромагнітного походження. Другі залежно від способу реалізації поділяються на організаційно-технічні, архітектурно-планувальні і акустичні. Останні засоби поділяються на засоби звукоізоляції, звукопоглинання, віброізоляції, демпфування і глушники шуму [25].

Згідно з ГОСТ 12.1.029-80 засоби індивідуального захисту залежно від конструктивного виконання поділяються на протишумні навушники, протишумні вкладиші, шоломи та каски, костюми [25].

Зменшення шуму в джерелі його виникнення можливе завдяки якісному монтажу технологічного устаткування і машин, їх правильній експлуатації. Зокрема, планово-запобіжні ремонти повинні включати усунення розбалансування деталей, перекосів у частинах, які пересуваються [25].

Організаційно-технічні методи колективного захисту від шуму згідно з ГОСТ 12.1.029-80 включають застосування малошумних технологічних процесів, оснащення машин засобами дистанційного управління та автоматичного контролю, використання малошумних машин, зміни конструктивних елементів машин [25].

Зменшення впливу підвищеного рівня ультрафіолетової радіації. До засобів колективного захисту від УФ-випромінювання відносяться різні пристрої (огороджувальні, вентиляційні, автоматичного контролю і сигналізації, дистанційного управління), а також попереджувальні знаки. Індивідуальний захист від УФ-випромінювання здійснюють екранами: фізичними (у вигляді різних предметів, що поглинають, розсіюють або відбивають промені) і хімічними (хімічні речовини та захисні креми, що містять інгредієнти, які поглинають УФ-випромінювання). Для захисту також використовують виготовлений із тканини спеціальний одяг, окуляри із захисними фільтрами. Повний захист від УФ-випромінювання усіх хвиль забезпечує флінтглас (скло, що містить окис свинцю) товщиною 2 мм. При влаштуванні приміщень враховують, що відбиваючі властивість різних матеріалів для УФ-випромінювання і видимого світла різні. Фарби на олійній основі, оксиди титану та цинку погано відбивають УФ-випромінювання, а крейдяна побілка, полірований алюміній – добре [26].

Захист працівників від несприятливого впливу хімічних небезпечних і шкідливих виробничих факторів. Контроль ризиків вдихання хімічних речовин в ході штатної роботи підприємств повинен здійснюватися на основі результатів аналізу техніки безпеки і промислової гігієни. Заходи запобігання включають інструктаж робітників, систему видачі дозволів на ведення робіт, використання

засобів індивідуального захисту і систем виявлення отруйних газів з сигналізацією [26]. Додатково рекомендовані заходи включають наступне:

- застосування розділених перегородками робочих зон;
- установлені струменеві витяжні ковпаки;
- виробничі зони обладнані належними системами вентиляції;
- переміщення і поділ рідин, фільтрація твердих речовин і рідин, а також грануляція, сушка, розмелювання, змішування і стиснення продукту повинні проводитися в робочих зонах з хорошою вентиляцією;
- застосовувати найменш небезпечних реагенти;
- стерилізаційні ємності розташовувані в окремих приміщеннях.

Розрахунок загальнообмінної вентиляції для нормалізації температури робочого приміщення – лабораторії кафедри біотехнології НАУ.

Одним з негативних факторів впливу під час роботи в лабораторії є підвищення температури. Виконання дослідів для дипломної роботи проходило в теплу пору року. Джерелами підвищення температури в приміщенні були автоклави, термостати, сушильні шафи, дистильатор, електронні плити, горілки. У теплу пору року ці прилади спричиняють підвищення температури повітря робочого повітря до 34-38 °С при відносній вологості 40-60%. Ці показники спричиняють негативний вплив на організм людини. Відкриті джерела, такі як нагрітий метал, спиртівки, гаряче скло, спричиняють інтенсивне теплове опромінення. В нормі показники не повинні перевищувати 140 Вт/м².

При боротьбі з надмірним теплом необхідний повітрообмін визначається з умов асиміляції теплових надлишків об'ємом повітря, що подається, м³/год [28].

$$L_n = \frac{Q_{надл}}{c \cdot \rho_{np} \cdot (t_{вид} - t_{np})},$$

де: $Q_{надл}$ - надлишкові тепловиділення, Вт;

c – питома теплоємність припливного повітря, в розрахунках беремо 1,01 Дж/(кг*К);

ρ_{np} - густина припливного повітря, в розрахунках беремо 1,2 кг/м³;

$t_{вид}$ – температура повітря, яке видаляється з приміщення, °К;

t_{np} – температура повітря, яке подається в приміщення, °К.

Беручи до уваги індивідуальне значення кожного джерела тепловиділення у приміщенні, сумарне значення $Q_{надл} = 1000 \text{ Вт} = 36 \cdot 10^5 \text{ Дж/год} = 860,421 \text{ Ккал}$. Показники температури повітря, яке виводиться з приміщення ($t_{вид}$) – 38 °С (311,15 °К), температура повітря, яке подається в приміщення лабораторії (t_{np}) – 20 °С (293,15 °К). Ці данні нам потрібні для розрахунку необхідного повітрообміну L_n :

$$L_n = \frac{Q_{надл}}{c \cdot \rho_{np} \cdot (t_{вид} - t_{np})} = \frac{860,421}{0,24 \cdot 1,2 \cdot (311,15 - 293,15)} = 165,98 \text{ м}^3/\text{год}.$$

Враховуючи, що площа лабораторії не має великих об'ємів, тому при проведенні дослідів для комфортної та безпечної роботи достатньо використовувати систему кондиціонування повітря з можливістю індивідуальної корекції показників температури та об'єму повітря, що надходить.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки під час при дослідженні впливу стимуляторів росту на процес біосинтезу біологічно активних речовин у виробництві лікарських засобів

Перед початком роботи в лабораторії кожен співробітник повинен бути ознайомлений з правилами пожежної безпеки, пройти протипожежний інструктаж та перевірку знань з питань пожежної безпеки [27].

У приміщенні лабораторії розміщені лише потрібні для зручної роботи прилади, приладдя, моделі, посібники та інші паперові вироби потрібно зберігати у спеціально відведених стелажах. У приміщенні проводяться тільки ті досліді, які передбачені програмою. Кожен працівник зобов'язаний зяти пожежонебезпечні властивості хімічних реактивів і речовин, засоби їх гасіння та дотримання правил заходів безпеки під час роботи [27].

У разі застосування легкозаймистих речовини (ЛЗР) та групи речовин (ГР), гази необхідно дотримуватися вимог Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях (наказ МНС України від 11.09.2012р. №1192). ЛЗР і ГР зберігають чітко за асортиментом у металевих ящиках та шафах. Речовини

зберігаються в кількості, яка забезпечує потребу. Забороняється зберігати разом речовини, взаємодія яких може призвести до пожежі або вибуху. Порядок спільного зберігання речовин та матеріалів визначають згідно з вимогами додатка 3 до НАПБ А.01.001-2014 Правила пожежної безпеки в Україні [27].

Електрощити, групові електрощитки оснащені схемою підключення споживачів з пояснювальними написами і вказаним значення номінального струму апарата захисту (плавкої вставки) [27]. Резетки та вимикачі на горючі апарати встановлені тільки у разі наявності підкладеного матеріалу, який виготовлений з негорючої речовини.

У приміщенні лабораторії знаходиться припливно-витяжна вентиляція, яка вмикається за 5 хвилин до початку робочого дня і вимикається тільки в кінці роботи. Витяжні шафи обладнані верхніми та нижніми відсмоктувачами і бортиками, які запобігають стіканню рідини на підлогу. Робочі поверхні на яких працюють з відкритим вогнем та пожежовибухонебезпечними речовинами, окриті негорючим матеріалом.

У лабораторних приміщеннях забороняється [27]:

- влаштовувати тимчасові електромережі, прокладати кабелі та електропроводи безпосередньо по горючій основі;
- захарашувати евакуаційні шляхи та підступи до засобів пожежогасіння;
- зберігати в лабораторії ЛЗР та ГР в кількостях, вище добової норми зберігання;
- разі аварії забороняється виливати ЛЗР і ГР в каналізацію;
- користуватись витяжними шафами з розбитим склом або несправною вентиляцією, а також шафами, в яких є речовини, матеріали та устаткування, які не потрібні для конкретного досліджу;
- установлення й перестановка витяжних шаф не можуть проводитися без дозволу адміністрації. Не допускається, щоб витяжна шафа встановлювалася безпосередньо біля дверей;

– застосовувати вогонь для виявлення витікання газу з газопроводів і приладів, а також користуватись несправними газовими пальниками та приладами, курити;

– проводити вогневі, зварювальні та інші роботи без спеціального дозволу;

– працювати з лужними металами в приміщеннях з високою вологістю та допускати їх контакт з водою, хлоровмісними органічними сполуками.

Для запобігання накопичення зарядів статичної електрики на устаткуванні, а також на людях мають передбачатися такі заходи захисту [27]:

– відведення зарядів статичної електрики шляхом заземлення металевих частин апаратів, установок, устаткування, комунікацій і ємкостей, на яких вони можуть накопичуватися. Заземлювальні пристрої мають відповідати вимогам ПУЕ та ПБЕ;

– загальне й місцеве зволоження повітря до 70% відносної вологості та вище в небезпечних місцях приміщень або зволоження поверхні електролізуючого матеріалу;

– заповнення апаратів, ємкостей, закритих транспортних пристроїв та іншого устаткування інертним газом, переважно азотом;

– улаштування підлоги з підвищеною електропровідністю та електропровідних заземлених зон для зняття зарядів статичної електрики, що накопичуються на людях;

– застосування лійок зі струмопровідного матеріалу і заземлювати їх під час розливання рідин-діелектриків у скляні та інші посудини з ізолюючих матеріалів;

– заземлювання мідним дротом або пластиною гумових шлангів із металевими наконечниками, призначених для наливання ЛЗР і ГР у бочки, баки, цистерни, бутлі та інші ємності. Наконечники шлангів мають бути виготовлені з кольорового металу, що не утворює іскор.

Порядок дій у разі пожежі:

– оцінити обстановку і негайно повідомити про це найближчий пожежнорятувальний підрозділ за тел. 101 (112). При цьому необхідно назвати:

адресу об'єкта, вказати кількість поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, обстановку на пожежі, наявність людей, а також повідомити своє прізвище;

- вимкнути з мережі прилади електропостачання та систему вентиляції;

- задіяти систему оповіщення людей про пожежу;

- повідомити про виникнення пожежі керівника або особу, що його заміщує і відділ сторожової охорони Університету;

- вжити (по можливості) заходів до евакуації людей та збереження матеріальних цінностей, розпочати гасіння пожежі наявними первинними засобами пожежогасіння;

- організувати зустріч пожежно-рятувальних підрозділів.

4.4. Висновки до розділу

Отже, проаналізувавши умови праці у лабораторії кафедри біотехнології ФЕБІТ НАУ було виділено фізичні і хімічні небезпечні і шкідливі виробничі фактори, які поділяються на такі: підвищена температура повітря робочої зони; підвищений рівень шуму на робочому місці; підвищений рівень ультрафіолетової радіації [20]. Створено список заходів для мінімізації шкідливого впливу на організм працівника. Провівши розрахунок розрахунок загальнообмінної вентиляції для нормалізації температури робочого приміщення – лабораторії кафедри біотехнології НАУ зробили висновок що для комфортної та безпечної роботи достатньо використовувати систему кондиціонування повітря.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Небезпека для довкілля технології виготовлення лікарських засобів

Фармацевтичне виробництво базується на широкому використанні машин, апаратів, технологічних ліній і застосуванні специфічних способів очищення сировини та утилізації відходів виробництва документів [29].

Фармацевтична промисловість має свою систему контролю якості лікарських препаратів і охорони навколишнього середовища при їхньому виробництві, що постійно удосконалюється з урахуванням розвитку нових технологій, GMP і вимог, які пред'являються ринком до галузевих нормативних документів [29].

Відходи фармацевтичного виробництва утворюються протягом всього життєвого циклу лікарського засобу[29]. На рисунку 5.1 представлена схема організації виробництва лікарських препаратів і перераховані можливі види відходів та джерел забруднення лікарських препаратів.

До потенційних екологічних проблем, пов'язаних з фармацевтичним і біотехнологічним виробництвом, відносяться наступні: викиди в атмосферу, стічні води, тверді і небезпечні відходи, небезпечні матеріали, загрози для біорізноманіття; біоетика [29].

5.2. Викиди в атмосферу

З підприємств фармацевтичного і біотехнологічного виробництва в атмосферу можуть потрапляти летючі органічні сполуки, кислотні гази і тверді частинки, причому це відбувається як з точкових джерел, так і при неконтрольованому виділенні.



Рис. 5.1. Схема організації виробництва лікарських препаратів

Леткі органічні сполуки. Найбільш істотними джерелами викидів летючих органічних сполук (ЛОС) є виробничі процеси хімічного синтезу і екстракції. При первинному фармацевтичному виробництві викиди ЛОС відбуваються з випускних отворів реакторів, фільтраційних систем в процесі сепарації, в формі парів розчинників і сушарок, у формі неконтрольованих викидів з клапанів, резервуарів, насосів та іншого обладнання, в формі розчинників і інших ЛОС, пов'язаних з вилученням хімічними речовинами при екстракції природних продуктів, у формі розчинників в процесах, пов'язаних з попередньою ферментацією і ферментацією, а також з установок для збору та очистки стічних вод [30].

Викиди ЛОС при вторинному фармацевтичному виробництві можуть утворюватися в результаті змішування, хімічної сполуки, грануляції і приготування складів, в результаті операцій, що передбачають застосування розчинників або спиртових сумішей, а також при виробництві аерозолів [30].

Заходи щодо запобігання і зведення до мінімуму викидів розчинників і ЛОС [30]:

- зниження обсягу або заменшують використання розчинників і інших матеріалів з високим вмістом ЛОС, заміна їх продуктами з більш низькою летючість і перехід до використання оболонок і очисних розчинів на водній основі;

- здійснення програм запобігання і контролю витоку ЛОС з працюючого обладнання;

- здійснення програм запобігання і контролю втрати ЛОС з відкритих ванн і в процесі змішування, включаючи установку технологічних конденсаторів нижче виробничого обладнання за технологічною лінії для забезпечення;

- зниження, по можливості, температури робочих процесів;

- для операцій сушіння – використання закритих контурів з азотним середовищем;

- використання водо- і газовловлюючого обладнання замкнутого циклу для чищення реакторів і іншого обладнання.

Тверді частинки, що складаються з кінцевого продукту або напівфабрикату, можуть виділятися при масовому або вторинному виробництві. Найбільш поширеними джерелами твердих частинок є операції помолу, змішування, хімічної сполуки, приготування складів, таблетування та пакування [30].

Рекомендовані заходи по контролю викидів твердих речовин включають [31]:

- збір твердих частинок за допомогою установок повітрянофільтрації і їх рециркулювання в технологічний процес приготування (наприклад, пилу від таблеток) в залежності від вимог до даного продукту і параметрів технологічного процесу;

- установку в грануляційному обладнанні спеціальних фільтраційних систем. необхідна також установка камери знешкодження відходів, в якій тверді частинки віддаляються з повітря, для зниження швидкості потоку;

– установку високоефективних повітряних фільтрів в системі вентиляції, кондиціонування та обігріву для контролю викидів твердих частинок, як всередині, так і зовні, а також для запобігання перехресного забруднення. Вентиляційні повітроводи повинні бути відокремлені один від одного в цілях запобігання перехресного забруднення від різних технологічних процесів і полегшення очищення повітряного потоку;

– збір твердих частинок за допомогою установок повітряної фільтрації, як правило, з рукавними/тканинними фільтрами;

– в залежності від обсягу викидів і переважаючого розміру часток необхідно вивчити додаткові методи контролю викидів твердих частинок, такі як вологі скрубери і вологі електростатичні пиловловлювачі, особливо після очищення шляхом спалювання/термічного окислення.

Викиди відпрацьованих газів в результаті спалювання газу або дизельного палива в турбінах, бойлерах, компресорах, насосах та інших установках з метою виробництва електрики і тепла є істотним джерелом викидів в атмосферу від фармацевтичного та біотехнологічного виробництва [30].

Запахи. Основні джерела запахів, як правило, пов'язані з операціями ферментації. Рекомендовані заходи по контролю запахів включають [31]:

– розміщення нових виробничих об'єктів з урахуванням як достатності відстані до сусідньої, так і поширення запахів;

– використання димових труб такої висоти, яка відповідає практиці;

5.3. Стічні води

Технологічні стічні води. Стічні води в фармацевтичному і біотехнологічному виробництві залежать від конкретного технологічного процесу і можуть включати: стоки, що утворюються при хімічних реакціях; воду від промивання продукту; відпрацьовані кислотні та лужні стоки; стоки конденсату від процесів стерилізації та

очищення; стоки скруберов очищення повітря; стоки від очищення обладнання та виробничих приміщень; а також стоки від безрозбірного миття [31].

Основними контрольованими параметрами забруднюючих речовин в стічних водах, що утворюються в ході первинних виробничих процесів, є біологічна потреба в кисні (БПК), хімічна потреба в кисні (ХПК), загальний вміст зважених твердих речовин, вміст аміаку, токсичність, показник рН. У них можуть бути присутні й інші хімічні сполуки, включаючи, крім іншого, розчинники, органічні кислоти, органічні галогеніди, неорганічні кислоти, аміак, ціанід, толуол і активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) [31].

Рекомендовані заходи по скороченню джерел забруднення включають [32]:

- заміщення матеріалів, зокрема застосування біорозкладних матеріалів на водній основі замість органічних матеріалів на основі розчинників;
- використання процесів конденсації і сепарації для вилучення відпрацьованих розчинників і водного аміаку;
- поєднання потоків відпрацьованих розчинників для оптимізації їх очищення.

Очищення технологічних стічних вод. Методи очищення технологічних стічних вод в цій галузі включають поділ стоків в залежності від джерел забруднення, з попереднім очищенням концентрованих стоків, особливо тих, в яких присутні активні інгредієнти. Типові методи очищення стічних вод включають застосування: жироловлівачів, піновідстійники, флотатори пневматичного типу і водомасляного сепаратора для відділення масел і спливаючих твердих частинок; фільтраційних установок для відділення твердих частинок; осадження зважених твердих частинок з використанням освітлювачів; біологічну, як правило аеробну, очистку для зниження вмісту розчинних органічних речовин (БПК); видалення біологічних поживних речовин для зниження вмісту азоту і фосфору; хлорування стоків в разі потреби дезінфекції; зневоднення відходів очищення і їх розміщення в спеціально обладнаних місцях, призначених для захоронення небезпечних відходів [31].

5.4. Тверді і небезпечні відходи

Небезпечні відходи. Процеси основного виробництва у фармацевтичній галузі, як правило, характеризуються низьким коефіцієнтом виходу готового продукту по відношенню до сировини, в результаті чого утворюються в значній кількості відходів, особливо в ході ферментації і природного екстракції продукту. У процесі хімічного синтезу утворюються відходи, що містять відпрацьовані розчинники, реагенти, відпрацьовані кислоти, підстави, спирти, що містять воду або розчинники, кубові залишки, ціаніди і металовмістні відходи у формі рідин або шлаку, органічні побічні продукти і комплексні з'єднання металів. В процесі ферментації можуть утворюватися відпрацьовані кислоти, проміжні продукти, залишкові продукти і фільтраційні кеки, містять міцелій, наповнювачі фільтрів і невеликі кількості поживних речовин [32].

Іншими джерелами небезпечних або потенційно небезпечних відходів можуть стати сировина, відходи упаковки, відпрацьовані наповнювачі повітряних фільтрів, браковані і прострочені продукти, відходи лабораторних аналізів, вловлені системами контролю забруднення повітря [32].

На підприємствах фармацевтичного і біотехнологічного виробництва повинна проводитися оцінка ризиків, пов'язаних з поводженням з небезпечними матеріалами і їх використанням, і здійснюватися практичні заходи щодо запобігання і мінімізації таких ризиків. Застосування таких практичних заходів має бути письмово зафіксовано в "Плані контролю небезпечних матеріалів". Метою даного плану є розробка і здійснення систематизованого комплексу превентивних заходів проти аварійних викидів речовин, які можуть завдати серйозної шкоди навколишньому середовищу, а також здоров'ю та безпеці працівників і населення в результаті короткострокового впливу, а також пом'якшення тяжкості наслідків відбулися викидів [30].

Заходи щодо запобігання утворенню і контролю відходів включають:

- зменшення відходів шляхом заміщення матеріалів;
- модифікацію технологічних процесів;

- використання дистиляції, випаровування, декантування, центрифугування і фільтрації для повторної переробки і повторного використання розчинника;
- вивчення інших можливих варіантів видалення відходів;
- потенційно патогенні відходи, що утворюються під час біотехнологічного виробництва, повинні бути дезактивовані за допомогою стерилізації або хімічної очистки перед остаточним похованням.

5.5. Висновки до розділу

Отже, до потенційних екологічних проблем, пов'язаних з фармацевтичним і біотехнологічним виробництвом, відносяться наступні: викиди в атмосферу, стічні води, тверді і небезпечні відходи, небезпечні матеріали. Існує два напрямки передачі відходів: по вертикалі та по горизонталі. Відходи фармацевтичного виробництва утворюються протягом всього життєвого циклу лікарського засобу.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано, що фактори росту поділяються на основні групи: амінокислоти; пурини та піримідини; вітаміни. Ці речовини входять до основного складу клітини, але деякі організми не можуть їх самі синтезувати. Амінокислоти, пурини та піримідини мікроорганізми потребують у великих кількостях. Вітаміни при культивуванні необхідні в дуже малих кількостях.

2. Визначено що аргінін, аланін, триптофан, гістидин і фенілаланін збільшують літичну активність ферментів культури *B. clausii* по відношенню до тест-культур: *E. coli* на 34,8 – 55,3 %, *S. aureus* на 33,3 – 76,7%, *C. albicans* змін не спостерігалось. Гліцин, цистеїн та метіонін знижували літичну активність по відношенню до *E. coli*, *C. albicans* и *S. aureus* на 52,20 – 65,2%, 35,3 – 82,4% і 33,3 – 33,5%, в порівнянні з контролем.

3. Показано що при додаванні в поживне середовище комплексу амінокислот ступінь лізису клітин грам-негативних бактерій (*E. coli*) зростає на 45%. В той час лізис грам-позитивних бактерій (*S. aureus*) та дріжджів був нижчий ніж в контрольному середовищі.

4. Визначено, що гліцин, цистеїн та метіонін знижують літичну активність ферментів культури *B. clausii* 33,3 – 65,2 %, тому їх застосування як фактори росту – не рекомендовано.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бондаренко В. М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микрoэкологических нарушениях // *Consilium medicum*. 2005. – № 1. – С. 36–45.
2. Сорокулова И. Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов // *Антиб. и химиотер.* 1996. – № 10. – С. 13–15.
3. Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, используемый для получения препарата для профилактики и лечения воспалительных процессов и аллергических заболеваний / Никитенко В. И., Никитенко И. К.; опубл. 30.03.92 //
4. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // *Хим. и биол. безопасность.* – 2007. – № 2–3. – С. 20–41.
5. Hong H.A., Duc L.H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29, N 4. – P. 813–835.
6. Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В. Вітаміни в здоров'ї людини / Ю.М. Пархоменко, Г.В. Донченко. – К. : Академперіодика, 2006. – 182 с., 3 с.
7. Saarela M., Mongensen G., Fonden R., Matto J., Mattila–Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties // *J. Biotechnol.* – 2000. – Vol.84. – № 3. – P. 197–215.
8. Socol C.R., Vandenberghe L.P., Spier M.R. et al. The potential of probiotics: a review // *Food. Technol. Biotechnol.* – 2010. – Vol.48. – № 4. – P. 413–434.
9. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Микрофлора и здоровье человека. – К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
10. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
11. Godic Torcar K., Matijasic B.B. Partial characterisation of Bacteriocins produced by *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products // *Food Techhol. and Biotecchol.* – 2003. – Vol. 41, N 2. – P. 121–129.
12. Ciffo F. Determination of the spectrum of antibiotic resistance of the *Bacillus subtilis* strains of Enterogermina // *Chemio- terapia.* – 1984. – Vol. 2, N 1. – P. 45–51.

13. Cenci G., Trotta F., Caldini G. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii* // *J. Appl. Microbiology*. – 2006. – Vol. 101. – P. 1208–1215.
14. Yumoto I., Nakajima K., Ikeda K. Comparative study on cytochrome content of alkiliphilic *Bacillus* strains // *J. Ferment. Bioeng.* – 1993.– Vol. 83. – P. 466–469.
15. Hosoi T., Kiuchi K. Natto – a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto) // *Handbook of Fermented Functional Foods* / Farnworth E.R. (editor). – Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2003. – P. 227–245.
16. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология: Учебник для вузов. – М.: Издательство Московского университета, 2012. – 480 с.
17. Мельничук М.Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 252 с.
18. Виестур У.Э., Шмите И.А., Жилевич А.В. Биотехнология: биотехнологические агенты, технология, аппаратура. Рига: «Зинатне» 1987. – 263 с.
19. Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rashmi H.N., Tamil Selvi A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities // *Bioresource Technology*. – 2007. – V. 98. – № 14. – P. 2758–2764.
20. ГОСТ 12.0.003-74. Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация.
21. Постанова № 42 від 01.12.99 – Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99.
22. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку.
23. ГОСТ 12.4.080-79 ССБТ. Светофильтры стеклянные для защиты глаз от вредных излучений на производстве. Технические условия.
24. Постанова № 42 від 01.12.99 – Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень ДСН 3.3.6.042-99.

25. Сафонов В.В., Діденко Л.М., Мелашевич В.В., Стрежекуров Е.Є., Абракітов В.Е., Піліпенко А.В., Гасило Ю.А., Бровченко К.А., Папірник Р.В. Охорона праці під час виготовлення та монтажу будівель і споруд з металевих конструкцій / (За ред. В.В. Сафонова). К.: Основа, 2004. – 384 с. – Із грифом МОН України.
26. ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
27. Наказ МОН від 15.08.2016 № 974 “Про затвердження Правил пожежної безпеки для навчальних закладів та установ системи освіти України”.
28. Методичні вказівки до дипломного проекту «Розрахунок загальнообмінної вентиляції» з розділу «Охорона праці» /Укладачі: Л.О.Гурець, О.П.Будьоний.– Суми: Видавництво СумДУ, 2010. – 23с.
29. Murphy P. R. Green logistics: Comparative views of environmental progressives, moderates, and conservatives / P. R. Murphy // Journal of Business Logistic 2010. – [Електронний ресурс]. – Режим доступа: http://findarticles.com/p/articles/mi_qa3705/is_199601/ai_n8748499/.
30. Leibovitz H. Cost-Effective System for Recycling Plastics / H. Leibovitz // NAPM Insights. – March. – 2008. – P. 43.
31. Сагайдак-Нікітюк Р. В. Логістика управління відходами фармацевтичної галузі : моногр. / Р. В. Сагайдак-Нікітюк – Х. : ППВ «Нове слово», 2010. – 290 с.
32. Программа Организации Объединенных Наций по окружающей среде GENERAL UNEP/CHW.6/20 22 August 2002. Экологически обоснованного регулирования биомедицинских и медицинских отходов (Y1; Y3). Технические руководящие принципы [Електронний ресурс] // Конференция сторон Базельской конвенции о контроле за трансграничной перевозкой опасных отходов и их удалением. – Режим доступа до сайту: <http://www.basel.int/meetings/cop/cop6/russian/20r.pdf> .
33. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: Учебное пособие / Громова Н. Ю., Косивцов Ю. Ю., Сульман Э. М. – Тверь: ТГТУ, 2006. – 84 с.
34. Сорокулова И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 2. – С. 20 – 23.

35. Определение содержания витаминов и биологически активных веществ в растительных экстрактах различными методами / Шелеметьева О.В., Сизова Н.В., Слепченко Г.Б. / Химия растительного сырья. – 2009. №1. С. 113–116.1
36. Евстигнеева Р.П. Тонкий органический синтез/ Р.П. Евстигнеева.– М.: Химия, 1991. – 184с.
37. Мазанкова Л.Н., Лыкова Е.А. Пробиотики: характеристика препаратов и выбор в педиатрической практике // Дет–ские инфекции. – 2004. – № 1. – С. 18 – 23.
38. Никитенко В.И. Вместо лекарств – бактерии // Наука в СССР. – 1991. – № 4. – С. 116–121.
39. Нековаль І.В. Н47 Фармакологія: підручник / І.В. Нековаль, Т.В. Казанюк. – 4-е вид., виправл. – К.: ВСВ «Медицина», 2011. – 520 с. І8ІЯМ 978– 617– 505– 147– 4.
40. Громова Н.Ю., Косивцов Ю.Ю., Сульман Э.М. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: Учебное пособие. Тверь: ТГТУ, 2006. 84 с.
41. Евстигнеева Р.П. Тонкий органический синтез/ Р.П. Евстигнеева.– М.: Химия, 1991.- 184с.
42. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств./ М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов.– М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 264с.
43. Грачева И.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия/ И.М. Грачева.– М.: Пищевая промышленность, 1992.– 383 с.
44. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В.А. Быков, И.А. Крылов, М.Н. Манаков и др.– М.: Высшая школа. Кн.6.: Биотехнология.–1987. – 143 с.
45. Осипова И.Г., Михайлова Н.А., Сорокулова И.Б. и др. Споры пробиотики // Журн. микробиол. – 2003. – № 3. – С. 113–119.
46. Degtyaryova I., Skrypnyk I., Skopichenko S. Modern approaches to antihelicobacterial therapy and primary prophylaxis of the intestinal dysbiosis in peptic ulcer patients // Gut. – 2001. – Vol. 49, suppl. III. – P. 3166.
47. Duc le H., Hong H.A., Barbosa T.M. et al. Characterization of Bacillus probiotics available for human use // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, N 4. – P. 2161– 2171.

48. Elson C.O., Cong Y. Understanding Immune-Microbial homeostasis in intestine // *Immunol. Res.* – 2002. – Vol. 26. – P. 87–94. 35. Fiorini G.
49. Jadamus A., Vahjen W., Simon O. Studies on the mode of action of probiotics: effects of the spore-specific dipicolinic acid on selected intestinal bacteria // *J. Agr. Sci.* – 2005. – Vol. 143. – P. 529–535.
50. Luc R.G. La importancia del *Bacillus subtilis* en la terapeutica intestinal // *Med. Clin.* – 1958. – Vol. 31, N 9. – P. 420–424.
51. Mazza P., Zani F., Martelli P. Studies on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy // *Boll. Chim. Farm.* – 1992. – 131. – P. 401–408.
52. Muscettola M., Grasso G., Blach-Olszewska Z. et al. Effects of *Bacillus subtilis* interferon production // *Pharmacol. Res.* – 1992. – Vol. 26. – P. 176–177.
53. Nakano M.M., Zuber P. Anaerobic growth of a «strict aerobe» (*Bacillus subtilis*) // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1998. – Vol. 52. – P. 165–190.
54. Nista E.C., Candelli M., Cremonini F. et al. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 20. – P. 1181–1188.
55. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. И. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 654 с.
56. Татарченко И.И., Мохначев И.Г., Касьянов Г.И. Технология субтропических и пищевкусковых продуктов. – М.: Издательский центр "Академия", 2004. – 384 с.
57. Твердохлеб Г.В., Раманаускас Р.И. Химия и физика молока и молочных продуктов. – М.: ДеЛи принт, 2006. – 360 с.
58. Degtyaryova I., Skrypnyk I., Skopichenko S. Modern approaches to antihelicobacterial therapy and primary prophylaxis of the intestinal dysbiosis in peptic ulcer patients // *Gut.* – 2001. – Vol. 49, suppl. III. – P. 3166.
59. Duc le H., Hong H.A., Barbosa T.M. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, N 4. – P. 2161–2171.

60. Urdaci M.C., Bressollier Ph., Pinchuk I. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities // J. Clin. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 38, N2. – P. 385–386.
61. Vacca A., Pantaleo G., Ronco M., Dammacco F. Chemo-immunotherapy for multiple myeloma using an intermittent combination drug schedule (Melphalan + Prednisolone) and alternating courses of *Bacillus subtilis* spores // Chemioterapia. – 1983. – Vol. 2, N 5. – P. 300–306.
62. Von Wright A. Regulating the safety of probiotics – the European approach // Curr. Pharm. Des. – 2005. – Vol. 11. – P. 17–23.
63. Варбанец Л.Д., Мацелюх Е.В. Пептидазы микроорганизмов и методы их исследования. – Киев: Наукова думка, 2014. – 325 с.
64. Кудрявцев В.А., Осадчая А.И., Сафронова Л.А. Аэробы рода *Bacillus* как источник продуцентов литических ферментов. // Биотехнология. – 2004, № 4. – С. 24–33.
65. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3. – С. 20–41.
65. Рязанова Л.П. Действие протеолитических ферментов *Bacillus licheniformis* и лизомидазы *Lysobacter* sp.XL1 на клетки *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*/ Л.П.Рязанова, Л.А.Ледова, Н.В.Цурикова, О.А.Степная, А.П.Синицын, И.С.Кулаев// Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. – № 5. – С. 558–564.
66. Сафронова Л.А., Зеленая Л.Б., Ключко В.В., Авдеева Л.В., Рева О.Н., Подгорский В.С. Гено- и фенотипическая характеристика штаммов бациллярных компонентов эндоспорина // Микробиол. журнал. – 2012. – Т. 74. – № 5. – С. 55–66.
67. Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rashmi H.N., Tamil Selvi A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities // Bioresource Technology. – 2007. – V. 98. – № 14. – P. 2758–2764.