Ф А 2.2.1-32-367

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НАТИВНИХ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ НА РОЗВИТОК ЛАКТОБАКТЕРІЙ»**

Виконав: здобувач вищої освіти 2 курсу групи ПБТм21(1,5д)-01а
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Владислав ОНОПРІЄНКО
Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології, к. фарм. н., с.н.с.
Наталія ДВІНСЬКИХ
Рецензент:
Доцент закладу вищої освіти кафедри промислової фармації та економіки ІПКСФ НФаУ, к.фарм.н, доцент
В’ячеслав ШЕВЧЕНКО
Зав. лаб. загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ», к. м. н., с.н.с. Олена ПЕРЕТЯТКО

Харків – 2023 рік

АНОТАЦІЯ

В роботі досліджено бактеріотропну дію екзометаболітного комплексу штаму *Lactobacillus plantarum* UCM-2693, отриманого при культивуванні на рідкому середовищі МРС-1. На підставі аналізу отриманих результатів виявлено стимулюючий вплив метаболітного комплексу на ріст біомаси лактобактерій, на збільшення активності кислотоутворення. Результати підтверджують актуальність та перспективність проведення подальших робіт з використання метаболітних комплексів пробіотичних бактерій для створення препаратів-метабіотиків та для удосконалення складу молочнокислих заквасок. Робота складається з вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 65 стор., кількість таблиць 9, рисунків 16, джерел літератури 39, додатків 1.

Ключові слова: лактобактерії, живильне середовище, екзометаболіти, біомаса, кислотність.

ANNOTATION

The work investigated the bacteriotropic effect of the exometabolite complex of Lactobacillus plantarum UCM-2693 strain, obtained during cultivation on MRS-1 liquid medium. Based on the analysis of the obtained results, the stimulating effect of the metabolite complex on the growth of the biomass of lactobacilli and on the increase in the activity of acid formation was revealed. The results confirm the relevance and perspective of further work on the use of metabolic complexes of probiotic bacteria to create metabiotic preparations and to improve the composition of lactic starters. The work consists of an introduction, three sections, a conclusion. Total volume of work 65, number of tables 9, figures 16, sources of literature 39, appendices 1.

Key words: lactobacilli, nutrient medium, exometabolites, biomass, acidity.

ЗМІСТ

Вступ…….. 3

Розділ 1 Огляд літератури……..….. 6

1.1 Мікрофлора організму та її вплив на організм…….. 6

1.2 Джерела лактобактерій в раціоні людини……. 7

1.3 Властивості лактобактерій та їх функції в організмі людини……. 9

1.4 Взаємовідносини макроорганізму з пробіотичною мікрофлорою. 10

1.5 Пробіотичні мікроорганізми як препарати профілактичного та лікувального призначення…… 12

1.6 Механізми пробіотичної дії лактобактерій…….. 14

1.7 Пребіотики…… 17

1.8 Біохімічні та біофізичні умови розвитку лактобактерії……. 18

1.9 Історія створення та напрямки розробки живильних середовищ для лактобактерій……. 19

Розділ 2 Об’єкти та методи досліджень……. 24

2.1. Об’єкти досліджень……. 24

2.2. Методи досліджень……..... 30

Розділ 3 Експериментальна частина…… 37

3.1 Дослідження характеристик штаму *L. plantarum* UCM-2693…… 37

3.2 Дослідження якості препарату «Лактобактерин-Біофарма»……. 40

3.3 Дослідження якості антимікробної закваски Lyofast LPR A……. 43

3.4 Отримання екзометаболітного комплексу лактобактерій…….. 46

3.5 Дослідження бактеріотропної дії екзометаболітного комплексу (ЕК) лактобактерій…… 47

3.6 Аналіз результатів досліджень бактеріотропної дії ЕК…….. 51

3.7 Перспективні напрямки та пропозиції до подальших досліджень.. 53

Висновки……..…… 59

Список використаних джерел…….. 61

Додаток. Публікації за темою роботи……. 66

ВСТУП

Актуальність теми. Внаслідок незбалансованого харчування, дефіциту вітамінів, мікроелементів, прийому антибактеріальних препаратів, а також під дією забруднення навколишнього середовища, що все збільшується, потенційно небезпечними для живих організмів хімічними сполуками відбувається руйнування природних мікробіоценозів людини, що еволюційно склалися. Оскільки частота поширення дисбактеріозу травного тракту за деякими оцінками досягає 90%, очевидно, наскільки важливими є дослідження, спрямовані на створення препаратів, що відновлюють мікроекологічний баланс в організмі.

В останні часи все більше фахівців вважають, що настає нове розуміння концепції пробіотикотерапії або її природний розвиток. Створювані за допомогою пробіотиків біологічно активні сполуки, які отримали назву «метабіотики», «постбіотики» та ін., з відомою структурою, будуть мати здатність, з одного боку, пригнічувати розвиток у кишечнику патогенних бактерій, а з іншого боку – ефективно стимулювати розмноження індигенної мікрофлори кишечника. І, можливо, майбутні метабіотики виявляться більш ефективними у профілактиці та лікуванні мікроекологічних порушень кишечника, ніж традиційно використовувані протягом тривалого часу живі пробіотики.

До переваг неклітинних пробіотиків, крім більшого терапевтичного потенціалу, відносять високу біодоступність, відсутність конфлікту з власною мікробіотою макроорганізму, відсутність латентного періоду для реалізації біологічного ефекту, безпеку, вищі споживчі властивості лікарських форм та терміни придатності.

Метою дослідження є виявлення впливу екзометаболітного комплексу лактобактерій на ріст біомаси та активність кислотоутворення цих пробіотичних мікроорганізмів з метою визначення перспектив використання таких комбінацій при створенні препаратів-метабіотиків, для удосконалення

складу молочнокислих заквасок та в інших напрямках, де важливим є надання бактеріотропного впливу на корисних представників мікробіому людини.

Завдання дослідження:

- провести аналіз джерел літератури щодо перспектив застосування препаратів-метабіотиків;
- провести вибір об'єктів дослідження – продуцента екзометаболітного комплексу та лактобактерій для визначення його біктеріотропної дії;
- отримати комплекс екзометаболітів лактобактерій;
- дослідити вплив екзометаболітного комплексу *L. plantarum* UCM–2693на розвиток лактобактерій аналогічного виду та іншого (*L. rhamnosus*).
- провести порівняльний аналіз результатів досліджень бактеріотропної дії екзометаболітного комплексу на лактобактерії препарату «Лактобактерин» (*L. plantarum* 8Р-А3) та закваски «Lyofast LPR A» (*L. plantarum* та *L. rhamnosus*);.
- визначити перспективні напрямки та пропозиції до подальших досліджень.

Об'єкти дослідження: культура *Lactobacillus plantarum* UCM–2693, культуральна рідина після її культивування, препарат «ЛАКТОБАКТЕРИН-БІОФАРМА» (ПрАТ «БІОФАРМА»), антимікробна закваска для сиру «Lyofast LPR A» (фірма «Sacco», Італія).

Предмет дослідження. Вплив екзометаболітного комплексу, отриманого при культивуванні лактобактерій та доданого до живильного середовища, на ріст біомаси та динаміку кислотності середовища при культивуванні різних штамів лактобактерій на цьому середовищі.

Методи дослідження. В роботі проводили скринінг та аналіз літературних даних, використовували мікроскопічні методи для ідентифікації та контролю чистоти культури, метод забарвлення по Граму, культивували лактобактерії методом глибинного культивування на щільних та рідких живильних середовищах, контролювали мікробіологічну чистоту культури

методом прямого посіву, визначали динаміку росту біомаси методом розведень з висівом на щільні живильні середовища та спектрофотометричним методом, активність кислотоутворення визначали титриметричним методом та потенціометрично, біомасу від культуральної рідини відділяли центрифугуванням.

Практичне значення отриманих результатів. Виявлений стимулюючий вплив метаболітної композиції культуральної рідини лактобактерій на динаміку змін активної та титрованої кислотності, збільшення біомаси дозволяє запропонувати використання екзометаболітних комплексів в якості препаратів-метабіотиків, для підвищення продуктивності виробничих процесів отримання біомаси лактобактерій, які використовують як основні діючі речовини профілактичних та лікувальних лікарських засобів та добавок дієтичних, а також в інших галузях, зокрема у виробництві заквасок для молокопереробної промисловості

Апробація результатів дослідження і публікації.

Результати досліджень опубліковані в матеріалах конференції:

1. Двінських Н.В. Значення лактобактерій – продуцентів екзополісахаридів в заквасках / Двінських Н.В., Хохленкова Н.В., Онопрієнко В.О. // Мат. VI Міжнар. наук.-практ. конф. «Новітні досягнення біотехнології», 23–24 вересня 2022 р., Національний авіаційний університет / ред. кол.: Гаркава К. Г. та ін. — Київ, 2022. — С. 43-44.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.

Робота складається з вступу, трьох розділів - огляду літератури, об’єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 65 стор., кількість таблиць 9, рисунків 16, джерел літератури 39, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Мікрофлора організму та її вплив на організм

Мікрофлора – один із найважливіших компонентів не лише загалом біосфери, а й організму будь-якої людини. Вистилаючи як природний бар'єр всі тканини макроорганізму, що межують із зовнішнім середовищем, мікроорганізми відіграють роль у забезпеченні колонізаційної резистентності щодо збудників інфекційних захворювань, регуляції функції імунної системи, виробленні біологічно активних речовин. Кількісне та видове розмаїття представників нормальної мікрофлори в різних біотопах організму людини варіює в широких межах. Наприклад, в ротовій порожнині в 1 г слини міститься 10^6-10^9 колонієутворюючих одиниць (КОЕ) різних мікроорганізмів, у шлунку - менше 10^3 КУО, найбільше представників мікрофлори як кількісно (10^{10}-10^{12} КУО), так і якісно представлено в товстому кишечнику.[1-3]

Мікрофлора шлунка порівняно нечисленна і переважно представлена кислотостійкими *Lactobacillus, Stomatococcus, Sarcina*. Це зумовлено бактерицидною дією шлункового соку, що елімінує просвітну мікрофлору, яка потрапляє в шлунок у складі харчової грудки, дані бактерії можуть вижити лише на поверхні слизової оболонки в товщі шлункового слизу. У дванадцятипалій кишці кількість мікроорганізмів не перевищує 10^4–10^5 клітин на 1 мл вмісту, а видовий склад представлений лактобактеріями, біфідобактеріями, бактероїдами, ентерококами, дріжджоподібними грибами. У тонкій кишці чисельність мікроорганізмів коливається в межах від 10^4 клітин на 1 мл вмісту в худій кишці до 10^7-10^8 на 1 мл - у здухвинній. Мікробіота товстого кишечника є найчисленнішою, складаючи 60% всієї мікробіоти організму, і представлена 17 сімействами, 45 родами та більш ніж 1 тис. видів бактерій. Це переважно анаеробні бактерії — їхня загальна кількість досягає величезних значень: 10^{13}–10^{14}, що становить майже 90% усіх мікроорганізмів у товстій кишці. .[1-3]

Історія вивчення мікроорганізмів, що належать до компонентів нормальної мікрофлори, почалася в 1899 р., коли Tissier вперше виділив з калу здорової дитини, яка перебувала на грудному вигодовуванні, мікроорганізм роду *Bifidobacterium*. Це дозволило розглядати мікроорганізми не тільки як причину інфекційних захворювань, а й розпочати їх вивчення як компонентів нормального микробіоценозу людини. Надалі були виділені інші мікроорганізми, що належать до представників нормальної мікрофлори ШКТ: лактобактерії, ешерихії та ін. .[3-5]

В даний час вплив мікрофлори на макроорганізм розглядається як комплексний, різноспрямований:

- створення колонізаційної резистентності, що передбачає конкурентну взаємодію та пригнічення росту патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів;
- імуномодулюючу дію;
- участь у обміні речовин;
- дезінтоксикаційну дію;
- протиалергічний та антиканцерогенний вплив;
- інші ефекти.

1.2. Джерела лактобактерій в раціоні людини.

Джерело пробіотиків у раціоні – ферментована їжа. Людство одомашнило молочнокислі бактерії для ферментації молочних продуктів ще близько 8000 років тому. Виробництво йогурту та сирів уперше задокументовано ще у Стародавньому Єгипті. Стародавні римляни не тільки перейняли, а й значно удосконалили процес сироваріння, відкривши безліч нових сортів [1, 6]. У будинках заможних римлян навіть були приміщення, відведені для дозрівання сиру, а великих містах працювали спеціальні коптильні, куди можна було здати домашній сир.

Проте, незважаючи на назву, молочнокислі бактерії містяться не тільки в йогуртах та сирах, але й у широкому спектрі продуктів рослинного походження. Повний список джерел *Lactobacillus* у нашому раціоні:

- йогурт,
- кефір та інші види ферментованого молока;
- деякі сири (пармезан, моцарелла, ементаль, камамбер, рікотта);
- зелені столові оливки;
- солоні огірки;
- квашена капуста;
- закваска для випікання хліба;
- ферментовані ковбаси та салямі;
- національні ферментовані страви, наприклад, кімчі – корейська гостра квашена пекінська капуста з іншими овочами та спеціями. [1, 6-8]
- Щоб пробіотичні мікроорганізми принесли користь для здоров'я, вони повинні потрапити до нашого організму живими та достатньою кількістю. «Денна норма» становить 10^6 - 10^{10} живих клітин [3]. Подібна концентрація зустрічається у свіжому йогурті, 1 г якого містить близько 10^8 колонієутворюючих одиниць *Lactobacillus bulgaricus* (болгарської палички), та у твердих витриманих сирах, які до кінця дозрівання можуть містити до 10^7 – 10^8 молочнокислих бактерій. [8-10]

Таким чином, головне джерело лактобактерій у раціоні – ферментовані продукти. Особливо багатий на ці пробіотики домашній термічно необроблений йогурт і тверді витримані сири. Включення їх до раціону позитивно позначається не тільки на балансі кишкової мікрофлори, а й на здоров'ї в цілому.

Найчастіше для заселення кишечника та приготування молочнокислих продуктів використовуються такі види лактобактерій [1, 2, 9-10]:

- Рамнозус GG.
- Сирна паличка.
- Ацидофільна лактобактерія.
- Дельбрюківська паличка.
- Болгарська лактобацила

1.3. Властивості лактобактерій та їх функції в організмі людини

Lactobacillus – це частина здорової, корисної мікрофлори людини.

Лактобактерії – мікроорганізми групи молочнокислих бактерій (МКБ), здатні збродживати вуглеводи з утворенням молочної кислоти чи лактату. Саме завдяки цій властивості вони стали одними з перших мікроорганізмів, які почали використовувати для тривалого зберігання продуктів харчування. У процесі ферментації утворюються органічні кислоти, спирт та інші протимікробні речовини, що пригнічують ріст бактерій, здатних зіпсувати їжу або викликати харчове отруєння. Крім цього, ферментація знижує вміст лактози, яка може важко перетравлюватися у дорослих, і підвищує вміст поліфенолів, які мають антиоксидантну активність. [9, 11].

Представники роду *Lactobacillus* – важлива частина дружньої мікрофлори кишечника, ротової порожнини і піхви. Вони допомагають підтримувати здоров’я кишківника і правильне функціонування імунної системи, формують захисний бар’єр від шкідливих бактерій в кишечнику і сприяють травленню, розщеплюючи клітковину на корисні речовини [1, 2, 12].

Дитина отримує ці бактерії від матері під час пологів і при годуванні грудним молоком. З віком їх кількість починає знижуватися. Крім вікових змін, до зниження чисельності лактобактерій може призвести неправильне харчування, хвороби і прийом антибіотиків. Відновити їх популяцію в кишечнику можна вживаючи їжу, багату цими мікроорганізмами. [8]

Лактобацили можуть запобігати перекисному окисленню ліпідів та утворенню вільних кисневих радикалів завдяки їх здатності створювати низький окисно-відновний потенціал, необхідний для їх оптимального зростання. Амаретті та його колеги об'єднали штами *Bifidobacterium (B.) animalis subsp lactis* DSMZ 23032, *L. acidophilus* DSMZ 23033 та *L. brevis* DSMZ 23034 і вводили їх для 18 днів щурам, які раніше отримували антибіоцин. Аналіз антиоксидантної активності плазми, концентрації глутатіону, а також рівнів активних форм кисню виявив зниження окисного

стресу, спричиненого доксорубіцином, що підтримує антиоксидантну активність цих пробіотиків.

Лактобацили є потенційними ад'ювантами, що запускають слизові та системні імунні реакції. Імуномодулюючі ефекти лактобацил, що спостерігаються в різних фізіологічних системах, включають підвищену цитотоксичність природних клітин-кілерів та індукцію продукції інтерферону-γ та експресії цитокінів. Для того, щоб надавати ці імуномодулюючі ефекти, лактобацили повинні протистояти процесам травної системи та прилипати до кишкового епітелію господаря. Лактобацили (зокрема *L. acidophilus*) також можна вводити разом із біфідобактеріями для посилення імунної системи. Цей ефект досягається за рахунок посилення системного/місцевого імунітету та одночасного ослаблення системної реакції на стрес. [13]

Штами, що належать до родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, є найбільш вивченими у клінічній практиці. Кількість бактеріальних штамів, які досягають слизової оболонки кишечника і товстої кишки, залежить від декількох факторів, таких як використовуваний штам, виживання при шлунковому транзиті та переносимість кислоти та жовчі.

1.4. Взаємовідносини макроорганізму з пробіотичною мікрофлорою.

Те, що корисна мікрофлора здатна впливати на функціонування кишечника, за останні десять років стало зрозуміло не лише вченим, але навіть маленьким дітям, які з тим чи іншим ступенем задоволення поїдають «живі» йогурти. Менш відомим є той факт, що бактерії, які містяться в таких продуктах, зовсім не заселяють кишківник і затримуються там зовсім ненадовго.

Тим не менш, за даними швейцарських фахівців, ефект від такого тимчасового підселення набагато серйозніший: впроваджені в кишечник лактобактерії здатні впливати на обмін речовин, змінювати місце існування і навіть регулювати роботу печінки. При цьому, незважаючи на те, що

затримуються лактобактерії в організмі недовго, вони встигають змусити організм створити сприятливі для його колонізації умови. [11, 14, 15]

Історія симбіозу ссавців та бактерій налічує не одну тисячу років. Не є винятком і людина, у кишечнику якої міститься стільки мікробів, що їхня вага в сумі досягає 1-1,5% усієї маси людського тіла. У здорової людини біфідобактерії, що заселяють товстий кишечник, перетравлюють клітковину і синтезують деякі вітаміни. Крім того, біфідобактерії допомагають у становленні імунної системи та нормальному функціонуванні травної системи. Бактерії працюють, зрозуміло, не безоплатно: наш організм створює для них ідеальні умови - оптимальний температурний та газовий режим з належною вологістю; про їжу теж турбуватися не доводиться. [1, 16, 17]

Безумовно, на цьому «святі життя» не обходиться і без патогенних бактерій. До таких «поганих» відносяться постійно присутні, але які перебувають під наглядом «хороших» біфідобактерій, клостридії, бактероїди, стрептококи та кишкова паличка.

Порушення балансу з різних причин, серед яких і прийом антибіотиків, і неправильне харчування, і стрес, призводить до тяжких розладів — наприклад, синдрому подразненого кишечника, гастриту та виразок, серцево-судинних захворювань, раку різних відділів травної системи та навіть діабету, за рахунок розвитку стійкості до інсуліну. Бактерії впливають навіть на ефект лікарських препаратів, що приймаються. [1, 10, 14]

Найпоширенішим способом «поправити» мікрофлору, що похитнулася, залишається прийом пробіотиків – живих культур непатогенних бактерій. В основному це лакто- та біфідобактерії. Біфідобактерії входять до складу саме лікарських препаратів, прописуваних лікарем при дисбактеріозі, а лактобактерії, в основному – *L. paracasei* і *L. rhamnosus*, можна знайти в будь-якому хорошому йогурті з терміном придатності, що не закінчився.

Вони справді мають «позитивну дію» на мікрофлору кишечника, але лише за рахунок витіснення патогенних клостридій, стафілококів та

кишкової палички. До доведених властивостей належить ще стимуляція імунної системи.

Призначені лікарями біфідобактерії заселяти складки товстої кишки здатні, але лише за умови тривалого курсу прийому та дуже ослабленого стану власної мікрофлори. В іншому випадку це було б схоже на штурм людських нутрощів із співвідношенням сторін 1:10 000, причому не на користь гостей. [4, 18, 19]

Проте все вищеописане — це ефекти, які виникають у результаті взаємодії бактерій друг з другом, у крайньому разі — з клітинами імунної системи.

З'ясувалося, що хоч лактобактерії і не затримуються в організмі тривалий час і не витісняють біфідобактерії, вони змінюють їхній метаболізм на генетичному рівні. Більше того, впливають на обмін амінокислот і жовчних кислот в організмі людини, регулюючи активність печінки.

Про цілеспрямований вплив на роботу печінки вчені не стверджують, адже бактерії змінюють рівень амінокислот, ліпопротеїнів та метаболітів жовчних кислот у крові, на що печінка вже реагує збільшенням або зменшенням викиду жовчі. При цьому створюються оптимальні умови для життєдіяльності саме лактобактерій.

Вчені також дійшли висновку, що ефект залежить від вихідних умов — тобто особливостей обміну речовин конкретного організму та складу мікрофлори, що заселяє його кишечник.

1.5. Пробіотичні мікроорганізми як препарати профілактичного та лікувального призначення

Вивчення ролі мікрофлори у профілактиці та лікуванні низки захворювань, насамперед інфекційних, призвело до створення нових терапевтичних підходів, спрямованих на маніпулювання бактеріальною колонізацією різних біотопів організму людини. І як наслідок – до створення лікарських засобів, що належать до фармакологічної групи препаратів, що

впливають на мікробіоценоз. Серед них можна виділити 3 основні групи: пробіотики, пребіотики та їх поєднання – синбіотики.

Пробіотики представлені різними видами мікроорганізмів. Найбільш часто використовують як пробіотики бактерії родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*. Лактобактерії – це *L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. rhamnosus GG*; біфідобактерії - *B. bifidum, B. breve, B. longum, B. infantis, B. animalis*. Залишається дискутабельним питання використання мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus*. Проте в останні роки дослідження на людях наочно продемонстрували, що дані бактерії позитивно впливають на процеси травлення і усувають симптоми непереносимості лактози, що дозволяє віднести ці культури до пробіотиків [1, 2, 9, 11].

Перспективним підходом до терапії порушень мікробіоценозу ШКТ є використання пробіотиків метаболітного типу. Відмінними рисами даної категорії препаратів є відсутність у їх складі живих культур мікроорганізмів та присутність продуктів обміну речовин представників нормальної мікрофлори людини з різними типами метаболізму – цукролітичним та протеолітичним. [15, 20, 21].

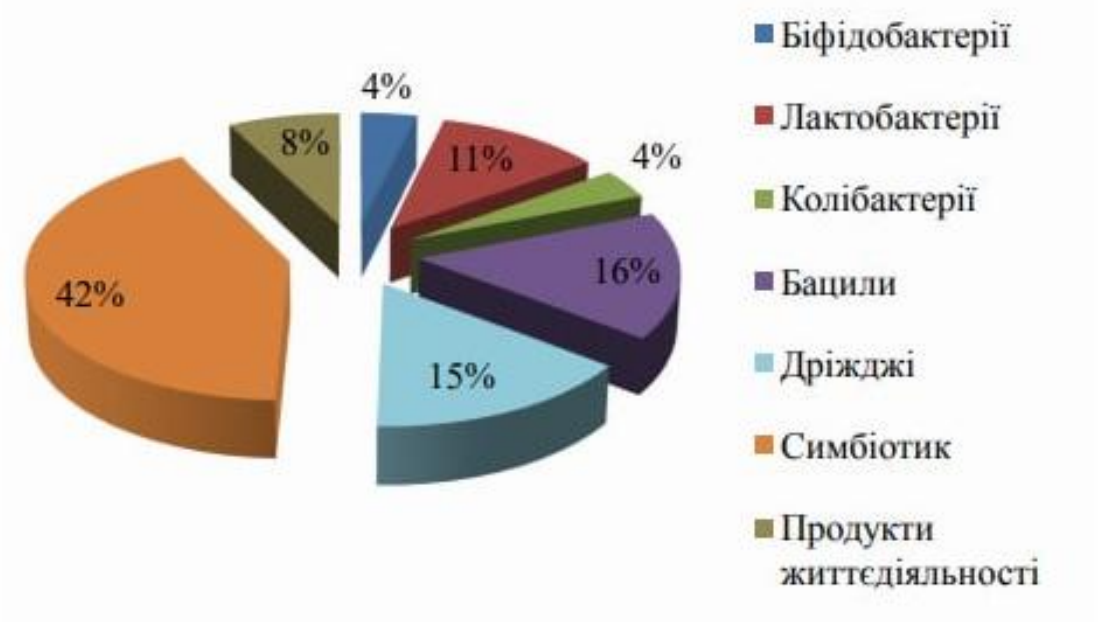


Рис. 1.1. Бактеріальна основа пробіотичних препаратів закордонних виробників [22, 23].

.

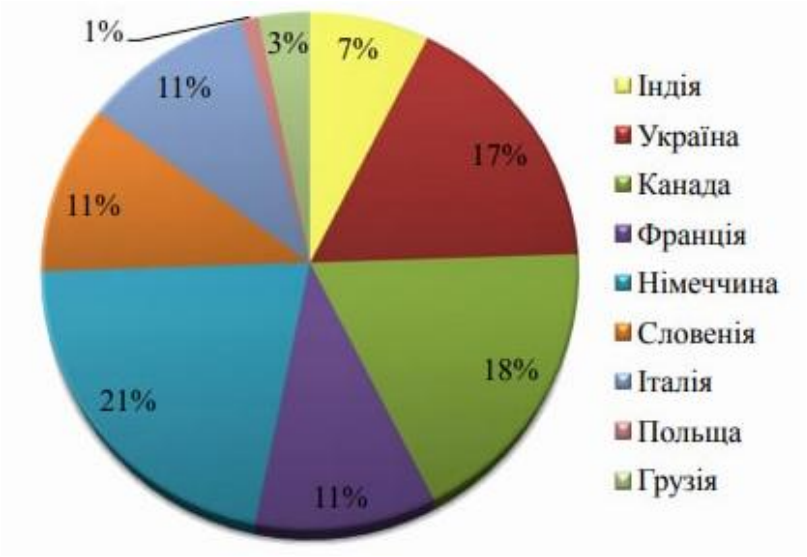


Рис. 1.2. Виробники пробіотичних лікарських препаратів, представлених на фармацевтичному ринку України [22, 23].

Одним із таких лікарських засобів, що належать до класу пробіотиків метаболітного типу, є Хілак форте. Унікальність складу даного препарату полягає в тому, що його основною діючою речовиною є численні продукти метаболізму таких представників нормальної мікрофлори, як *L. acidophilus* і *L. helveticus, Escherichia coli, Streptococcus faecalis*, це стерильний розчин екзометаболітів. Присутність метаболітів мікроорганізмів, що відносяться до нормофлори з різним типом метаболізму (для *L. acidophilus, L. helveticus* і *Streptococcus faecalis* властивий цукролітичний тип обміну речовин, а для *Escherichia coli* – протеолітичний), дозволяє реалізовувати благотворний вплив Хілака форте на мікробіом комплексно [23]. Завдяки підвищенню колонізаційної резистентності за рахунок антагоністичного впливу на патогенні та умовно-патогенні мікроби та стимуляції росту нормальної мікрофлори кишечника відбувається нормалізація складу власної мікрофлори ШКТ, виявляється протективна дія на фізіологічні та біологічні функції слизової оболонки кишечника.

1.6. Механізми пробіотичної дії лактобактерій.

Механізми регулювання чисельності патогенів у лактобактерії різноманітні.

По-перше, вони закисляють середовище - виробляють молочну та оцтову кислоти, тому навколо них утворюється кисле середовище, в якому зі шкідливих мікроорганізмів здатні вижити тільки найсильніші, решта гинуть. У ротовій порожнині вони знищують стрептококи та стафілококи, які провокують ангіни, гайморити та інші захворювання верхніх дихальних шляхів. У кишечнику та слизових пригнічують ріст дріжджових грибів, у шлунку вбивають гелікобактер пілорі – причиною виразки та гастриту. Навіть шигели — причина дизентерії та подібних до неї станів — і ті нестійкі до впливу кислого середовища лактобактерій.

Але це не єдиний фактор, за допомогою якого лактобацили вбивають грампозитивні бактерії.

По-друге, вони виробляють антибіотики. Лактобактерії здатні виділяти природні антибіотики - ацидофілін, лактолін, колод, лактоцидин та ін. Різні штами виробляють різні види антимікробних речовин.

По-третє, вони стимулюють вироблення секретів, що вбивають мікроби. Лактобацили беруть участь у синтезі лізоциму, який вбиває патогени у слині. А ще шлункового соку, де гине 70% мікроорганізмів.

По-четверте, вони активізують фагоцитоз - тобто процес поглинання клітинами-санітарами шкідливих бактерій. [1-4]

Взаємозв'язки між лактобактеріями та хворобами людини.

Представники роду *Lactobacillus* становлять менше 1% від усієї кишкової мікробіоти, проте дуже різноманітні та представлені понад 50 видами. Найпоширеніші з них – *L. casei, L. murinus, L. plantarum, L. rhamnosus ma L. delbruckeii*. Зміни їх чисельності пов'язані з багатьма хворобами людини [1-5, 9, 18, 24]. Тому лактобактерії у складі ферментованих продуктів та харчових добавок широко використовуються для лікування та профілактики. Дослідження виявили цілу низку їхніх позитивних ефектів на здоров'я людини, а саме :

- зниження непереносимості лактози;
- позитивний вплив на кишкову флору;

- профілактику кишкових інфекцій;
- стимуляцію імунної системи;
- зменшення запальних чи алергічних реакцій;
- регулювання перистальтики кишківника;
- покращення загального самопочуття;
- профілактику раку товстої кишки, серцевих захворювань та діабету.

Вміст лактобактерій корелює з ожирінням; титр лактобактерій зменшується при запальних захворюваннях кишечника та цукровому діабеті, хронічній хворобі нирок; титр *Lactobacillus fermentum* збільшується при аденокарциномі стравоходу [3, 18, 19].

Доведено, що кишкова мікрофлора робить великий внесок у патогенез ожиріння та асоційованих захворювань. Роль їжі: жирна їжа впливає на скорочення кількості біфідо- і лактобактерій [3, 15].

Лактобактерії та здоров'я жінки

Фізіологічна мікрофлора піхви жінки складається з різних типів бактерій, у тому числі лактобацил, що належать до роду *Lactobacillus*. Залишаючись у правильній кількості, вони захищають від росту чужорідних бактерій. Однак іноді мікрофлора піхви може змінитися [3, 24].

Репродуктивний орган є прикладом чудово розвиненої частини тіла. Кожен компонент має своє завдання. Кожен із них підтримує взаємне тісне співробітництво, щоб якомога довше підтримувати стан здоров'я, що у репродуктивному віці може безпосередньо впливати на фертильність людини.

Лактобактерії є превалюючим типом нормальної мікрофлори вульви та піхви (10^6-10^9 КУО/мл). Основні види представлених у піхві лактобацил наступні: *L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. cellobiosum*. Головні функції лактобактерій у піхві - підтримувати кисле середовище та пригнічувати рост умовно-патогенних мікроорганізмів. Раніше всі лактобактерії, що знаходилися у піхві, називали паличками Дедерлейна (на честь німецького гінеколога A. Doderlein (1860–1941).

Лактобактерії *L. crispatus, L. gasseri, L. jensenii ma L. iners* поряд з *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens*, *Eggerthella spp*. асоціюють з бактеріальним вагінітом. [3, 24].

1.7. Пребіотики.

Важливе значення у профілактиці та лікуванні дисбактеріозу кишечника мають пребіотики (до них в основному відносять розчинні харчові волокна класу вуглеводів: фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди). У шлунку та тонкій кишці вони уникають гідролізу травними ферментами і досягають товстої кишки у незмінному вигляді. Там піддаються ферментації біфідо- та лактобактеріями, що призводить до збільшення кількості флори та об‘єму калових мас. При цьому важливо підкреслити, що фруктоолігосахариди є енергетичним субстратом для представників нормальної мікрофлори кишечника (біфідо- та лактобактерій). У процесі ферментації утворюються коротколанцюгові жирні кислоти (переважно оцтова, пропіонова, масляна), які знижують pH у кишечнику, стимулюють перистальтику [15, 17, 20, 21].

Зміцненню захисного бар'єру товстої кишки при споживанні пребіотиків сприяє і стимуляція вироблення у ній слизу. Підвищене слизоутворення ентероцитами може бути наслідком зниження pH при збільшеному синтезі коротколанцюгових жирних кислот мікрофлорою кишечнику у відповідь на введення пребіотиків. Властивості пребіотиків найбільше мають інулін, лактулоза, лактил, олігосахариди, лактоолігосахариди та ін. [17, 20, 21].

Пробіотики сумісно з пребіотиками можуть застосовуватися для профілактики та лікування дисбактеріозу кишечника, в т. ч. при призначенні ерадикаційних схем лікування *Helicobacter pylori* при гастроезофагеальній рефлюксній, виразковій хворобі шлунка та дванадцятипалої кишки, ерозивних гастро- та дуоденопатіях [18, 21].

1.8 Біохімічні та біофізичні умови розвитку лактобактерій.

Для росту бактерій, як правило, потрібне відповідне біохімічне і біофізичне середовище. LAB - це група бактерій, яким для нормального росту потрібні багаті, складні середовища для культивування, і вони не можуть рости на простих мінеральних середовищах, доповнених тільки джерелом вуглецю. У доповненні до вуглеводів (простих цукрів, таких як декстроза, сахароза, мальтоза або лактоза), лабораторні середовища для культивування зазвичай містять різні джерела азоту (такі як пептон, дріжджовий екстракт, яловичий екстракт або сироватковий білок), мінерали (в основному Mn^{2+} і Mg^{2+}) і буферні агенти [1, 2, 19, 25, 26].

Прості вуглеводи або цукор є основними джерелами вуглецю та енергії для росту бактерій. Вуглець і енергія також можуть бути отримані з інших органічних компонентів, таких як джерело азоту. Гліцерин також пропонується в якості хорошого джерела вуглецю та енергії для деяких штамів, таких як *L.reuteri.*

Сахароза є найбільш часто використовуваним цукром для росту бактерій, в той час як лактоза, основний сахар у молочних продуктах, гідролізується відносно повільно і є однією з найменше використовуваних форм цукрів штамами лактобацил.

У молочній промисловості в якості джерел відновлених пептидів і амінокислот найчастіше використовується молоко, сухо знежирене молоко, сироватковий білок і сироватка.

У лабораторні середовища зазвичай включають більше одного типу джерел азоту.

Сульфат марганця ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$) і сульфат магнію ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) також включаються в середовище. Mn^{2+} необхідний для росту та метаболічної активності більшості мікроорганізмів, у тому числі лактобактерій. Крім того, Mn^{2+} є важливим елементом, який діє проти ендогенних кисневих радикалів для деяких LAB і відповідає за каталітичне окислення O_2, яке необхідне для анаеробного росту. Аналогічним чином,

Mg^{2+} може стимулювати ріст і покращувати виживаність LAB. Було показано, що Mg^{2+} є єдиним істотним олігоелементом, необхідним для росту *Lb. delbrueckii ssp. lactis*, а також є важливим іоном металу для росту *Streptococcus thermophilus*.

У середовищах для вирощування лактобактерій також можна використовувати поверхнево-активні речовини, такі як лецитин або твін. Поверхнево-активні речовини захищають клітини від несприятливих умов, покращують засвоєння поживних речовин. Твіни, такі як Tween 80 і 85, містять олеїнову кислоту, а Tween 20 містить лауринову кислоту. Жирні кислоти, подібні цим, усилюють зростання LAB. Не всі поверхнево-активні речовини, важливі для росту лактобактерій, хоча Tween 80 добре відомий своєю здатністю посилювати ріст більшості видів лактобактерій. Повідомлялося, що твин 80 має значний вплив на здатність до відновлення, переносимість жовчі, і метаболічну активність лактобактерій [2, 25, 26].

1.9 Історія створення та напрямки розробки нових живильних середовищ для лактобактерій.

LAB є найбільш широко використовуваною закваскою в ферментованих харчових продуктах, особливо в молочних. Лактобактерії мають здатність адаптуватися до різних умов, що може пояснити їх широке застосування для ферментації різноманітних харчових продуктів. Протягом двадцятого століття проведено значну кількість досліджень, пов'язаних з вивченням умов їх росту.

У першій половині двадцятого століття були проведені обширні дослідження потреб лактобактерій у поживних речовинах і живильних середовищах. Після визначення необхідних поживних речовинах, які можуть підтримувати рост лактобактерій, стало зрозуміло, які з них повинні бути присутні в живильних середовищах [2, 21, 26].

В 1920-х роках Уолтер Л. Кульп продемонстрував, що *Lactobacillus acidophilus* і *L. bulgaricus* погано ростуть в середовищі з пептонним сахарним агаром, тому він розробив нове середовище, використовуючи томатний сік в

якості основного інгредієнта. Оскільки агар із сироватки і томатного соку не давав стабільних результатів, було створене середовище із знежирених інгредієнтів, сахарний агар з триптиказою. Завдяки відкриттю незамінної дії вітамінів і розробці методів кількісного визначення вітамінів і амінокислот в 1940-х роках стало можливим створення середовища з хімічно визначеними компонентами.

Вслід за цими відкриттями були розроблені середовища для лактобацил на основі модифікації вихідного середовища для вирощування BRIGGS і середовища для стрептококів і лактобацил LAE. Ряд штаммов лактобацил погано росли і в цих середовищах [2, 25, 27].

В результаті в 1960-х роках була розроблене середовище, відоме як MRS, яке було здатне підтримувати ріст лактобацил.

У 1970-х роках Лоурі і Пірс помітили, що не всі лабораторні штами, і особливо стрептококи, здатні добре рости на середовищі MRS, тому буле розроблене альтернативне середовище M16. Однак, швидке зниження pH через ріст стрептококів у M16, привело до розробки нового середовища під назвою M17 з покращеною буферною здатністю. Тому MRS і M17 - стандартні середовища, які демонструють постійний ріст LAB. [2, 25, 27]

Використання стандартних середовищ, таких як MRS (в якості лабораторного середовища), і середовищ на основі знежиреного молока і сироватки (в якості сипучих середовищ) для культивування молочнокислих бактерій (LAB) має обмеження, такі як економічна ефективність, підготовка, низька щільність клітин і вимоги до контролю якості.

Наприклад, MRS вважається дорогим середовищем через використовуване джерело азоту (м’ясний та дріжджовий екстракти), до того ж воно не підтримує ріст багатьох лабораторних та пробіотичних культур.

Що стосується сипучих засобів, то для приготування та обробки потрібні додаткові кроки, а до приготування закваски повинні бути залучені навчені люди. Існують також проблеми, пов'язані з цими середовищами, такі

як досягнення щільності клітин і додаткові етапи контролю якості, щоб гарантувати, що культури досягають максимального росту.

У літературі представлені значні дослідження, спрямовані на розробку нових середовищ або пошук альтернативних недорогих інгредієнтів для зниження витрат або отримання більш високої щільності клітин [28, 29]. У доповненні до збільшення виробництва клітинної маси, середовища для культивування відіграють важливу роль у методиках для контролю якості молочних продуктів. Ці методи контролю якості включають мікробіологічні тести, такі як диференціація, вибірковий підрахунок, виділення та ідентифікація, які не можуть бути досягнуті за допомогою стандартних середовищ. Таким чином, все більше число досліджень було спрямовано на модифікацію стандартних середовищ для культивування LAB для застосування при контролі якості молочних продуктів. Дуже важливо, щоб дослідники створювали нові живильні середовища з альтернативними недорогими інгредієнтами, які добре підходять для таких застосувань.

Комерційний бульйон MRS від Difco містить протеозний пептон № 3, який отримують ферментативним розщепленням тканин тварин (бичого і свинячого білка). Цей інгредієнт був розроблений в якості альтернативного джерела азоту в знежирених харчових продуктах для задоволення різноманітних потреб лактобактерій в живленні. [29, 30]

Також було показано, що інші джерела нетваринного білка, такі як фітон-пептон (Phytone peptone), підтримують рост LAB. Фітон-пептон являє собою ультрафільтрований ферментативний перевар соєвого шрота і має буферну здатність, що сприяє ефективній підтримці рівня pH під час процесу ферментації. Було показано, що той білок посилює ріст і збільшує клітинну масу лактобацил. [29, 30]

Гідрохлорид L-цистеїну додають до MRS у низькій концентрації (0,05–0,1%, вага/об'єм) для підтримки мікроаерофільних умов та для виділення анаеробних видів LAB.

Основним інгредієнтом в M17 є триптон-пептон, який є панкреатичним перевaром казеїну, який рекомендований для швидкого росту та виявлення мікроорганізмів, присутніх у низьких концентраціях. Оригінальне середовище M17 містить поліпептон, який являє собою суміш пептонів з високим вмістом амінокислот і невеликих поліпептидів, характерних для панкреатичного розщеплення казеїну, плюс більш крупні поліпептиди, характерні для пептичного розщеплення тканин тварин.

Однак середовище містить інші інгредієнти: джерела вуглецю, азоту, вітамінів і мінералів, а також вітаміни та мінерали, Твін 80, ацетат, магній і марганець забезпечують фактори росту для культивування різних лактобацил. Дріжджовий екстракт містить вітаміни групи В, які стимулюють бактерійний ріст. Динатрієвий β-гліцерофосфат буферизує середовище, оскільки кислота утворюється в результаті ферментації лактози. Аскорбінова кислота стимулює ріст молочнокислих стрептококків, а сульфат магнію забезпечує необхідну кількість іонів магнію. Також можливо, що ці інгредієнти можуть інгібувати ріст деяких організмів, відмінних від лактобацил, при їх присутності в MRS, а також у M17. [1, 27-30]

Живильні середовища, які називаються APT (універсальний Твін 80 і агар) (рис. 1.3), також можуть бути використані для виділення деяких штамів лактобактерій. Але, хоча середовища APT розроблені для лактобактерій, зважаючи на досить багатий склад (гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, глюкоза) на них ростуть супутні мікроорганізми, у тому числі коліформні бактерії. [29-30]

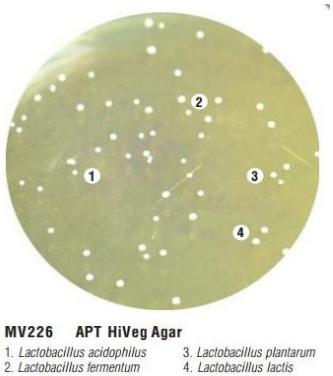


Рис. 1.3. Ріст лактобактерій на середовищі APT.

MRS також не є повністю селективною, тому багато досліджень було присвячено пошуку альтернативних селективних засобів. Крім того, інші роди LAB, такі як *Leuconostoc, Pediococcus, Enterococcus* і *Weissella*, можуть рости в MRS [1, 2, 28, 29]. Мікроорганізми цих видів мають аналогічні фізіологічні властивості і, як правило, реагують на умови або інгібіторні сполуки аналогічним чином може добре рости на MRS, але в інших середовищах, таких як Rogosa, цитрат глюкози дріжджового екстракту та тетразолій-сахароза (TS) середовища зазвичай використовуються для вирощування цих родів. Bille та ін. оцінили ефективність MRS з ванкоміцином для виділення лактобактерій із ферментованих молочних продуктів, що містять лактококи, такі як *Lactococcus lactis, Lc. diacetylactis* та лактобактерій із заквасок, таких як лактобацили та педіокки.

Висновок до І розділу

В розділі розглянуто історію вивчення мікрофлори організму, види та властивості мікроорганізмів, що належать до компонентів нормальної мікрофлори організму, вплив мікрофлори на макроорганізм людини, взаємовідносини макроорганізму з пробіотичною мікрофлорою - лакто- та біфідобактеріями. Проаналізовано джерела потрапляння, властивості та функції лактобактерій в організмі людини, біохімічні та біофізичні умови розвитку лактобактерій. Проаналізовано види живильних середовищ для вирощування лактобактерій, їх переваги та недоліки, особливості застосування. Виявлено, що перспективним підходом до терапії порушень мікробіоценозу ШКТ є використання пробіотиків метаболітного типу.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти досліджень.

В якості об'єктів досліджень використовували

- культура *Lactobacillus plantarum* UCM – 2693;
- культуральна рідина після культивування *L. plantarum* UCM – 2693;
- препарат «ЛАКТОБАКТЕРИН-БІОФАРМА (Lactobacterinum-BIOPHARMA)» виробництва ПрАТ «БІОФАРМА»;
- Антимікробна закваска для сиру LPR A виробництва фірми «Sacco», Італія.

2.1.1. Lactobacillus plantarum

В роботі використовували виробничий штам *L. plantarum* UCM – 2693, отриманий з колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного.

Морфологічні ознаки.

Представники цього штаму мають форму прямих паличок із закругленими кінцями, зібраних у ланцюжки різної довжини, або розташовані поодиноко або попарно (Рис. 2.2).

Довжина паличок та величина вигину зазвичай залежать від умов росту: складу живильного середовища, температурного режиму, аерації, і навіть віку культури [1, 2, 25].

Лактобацили не утворюють ендоспор. За Грамом забарвлюються позитивно, стають грамнегативними з віком і при підвищенні кислотності.

Більшість лактобацил нерухомі. Багато лактобацил утворюють екзополісахариди (extacellular polysaccharides, EPS). Іноді EPS лактобацил представлені капсулою.

L. plantarum – це палички із закругленими кінцями, прямі, зазвичай шириною 0,9-1,2 мкм і довжиною 3-8 мкм, зустрічаються поодинці, парами або короткими ланцюжками. *L. plantarum* має один з найбільших геномів, відомих серед молочнокислих бактерій, і є дуже гнучким та універсальним

видом. За оцінками, він росте між pH 3,4 та 8,8. *L. plantarum* може рости в діапазоні температур від 12 до 40 °C. Життєздатні властивості *L. plantarum*, що зберігалися в охолодженому стані (4 °C), залишаються високими, тоді як при зберіганні при кімнатній температурі (25±1 °C) спостерігається значне зниження життездатності. [1, 2, 25]

Культуральні ознаки.

L.plantarum є факультативними анаеробами, що ростуть в атмосфері вуглекислого газу та азоту, а також у присутності кисню.

На щільних живильних середовищах лактобацили формують колонії сферичні, часто сочевицеподібні, гладкі, непрозорі, іноді блискучі, опуклі, з чіткими рівними контурами (Рис. 6). Зазвичай колонії дрібні, але в деяких видів їх розмір може перевищувати 4 мм у діаметрі. Колонії зазвичай не пігментовані, білі або трохи кремового кольору, іноді - жовтуваті або червоні. Деякі види утворюють шорсткі колонії. На середовищах із білками чи ліпідами зони просвітлення навколо колоній зазвичай не утворюються. Проте більшість лактобацил мають слабку протеолітичну активність (за рахунок секретованих і пов'язаних з клітинною стінкою протеаз і пептидаз) і слабку ліполітичну активність (завдяки внутрішньоклітинним ліпазам).

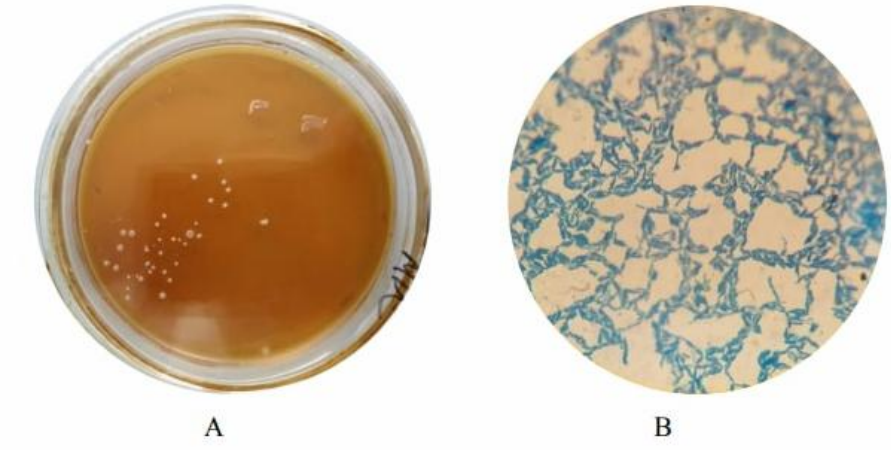


Рис.2.1 Культура *L.plantarum*: А – колонії на агаризованому середовищі MRS; В – клітини під світловим мікроскопом, х 1350

Амілолітична активність на агаризованих середовищах з крохмалем виявляється тільки у деяких видів. Окремі види лактобацил, до яких

належить *L. plantarum* здатні утворювати позаклітинні нуклеази при вирощуванні на агарі, що містить ДНК або РНК. [1, 2, 25]

При глибинному посіві на тверде живильне середовище утворюються щільні колонії у вигляді правильних лінз (сочевицеподібні), трикутної та неправильної форми або ніжні, що нагадують сніжинку або грудочку вати. Якщо в середовище було додано крейду, то навколо колоній унаслідок накопичення молочної кислоти утворюється зона розчинення крейди (Рис. 7).

Хороше зростання спостерігається в напіврідкому живильному середовищі, що містить 0,15-0,75% агару. Невеликі концентрації агару забезпечують низький окислювально-відновний потенціал середовища та створюють сприятливі мікроаерофільні умови. За характером росту в напіврідкому середовищі виділяють п'ять варіантів: (1) зростання кульками, (2) у вигляді поздовжньої смугастості, (3) придонний, (4) поверхневий, (5) рівномірне помутніння середовища.

При рості на рідких живильних середовищах лактобацили найчастіше викликають рівномірне помутніння, невдовзі після припинення росту осаджуючись у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівцеподібного осаду, ніколи не утворюючи плівок на поверхні середовища [1, 2, 25].

2.1.2. ЛАКТОБАКТЕРИН-БІОФАРМА (Lactobacterinum-BIOPHARMA)

Повна назва препарату – «ЛАКТОБАКТЕРИН - БІОФАРМА порошок д/ор. та місц. заст. по 5 доз у флак. №10»

Зовнішній вигляд препарату наведено на рис. 2.2.

Рис. 2.2 – Зовнішній вигляд упаковки препарату «Лактобактерин-Біофарма».

Реєстраційний номер UA/13647/01/01.

Склад лікарського засобу:

діюча речовина: живі штами лактобактерій (*Lactobacillus fermentum* або *Lactobacillus plantarum*). Одна доза містить не менше $2 \cdot 10^9$ КУО лактобактерій;

допоміжні речовини: сахароза або цукор дрібнокристалічний, желатин, молоко нежирне або згущене нежирне стерилізоване.

Лікарська форма. Порошок для орального та місцевого застосування.

Основні фізико-хімічні властивості: препарат представляє собою мікробну масу живих лактобактерій, ліофільно висушених; порошок (кристалічна або пориста маса) жовтувато-бежевого кольору з кисломолочним запахом та смаком. При додаванні води утворює гомогенну завись жовтувато-бежевого кольору.

Фармакотерапевтична група. Антидіарейні мікробні препарати. Організми, які продукують молочну кислоту. Код АТХ A07F A01.

Фармакологічні властивості. Терапевтичний ефект препарату визначають лактобактерії, що володіють антагоністичною активністю по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, створюють сприятливі умови для розвитку корисної мікрофлори кишечнику. Вказані властивості лактобактерій пов’язані з накопиченням ними (у процесі виробництва) молочної кислоти – сильного антисептика, який зумовлює активність препарату до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (які виявляються та активізуються на тлі тривалої дисфункції кишечнику).

Молочна кислота приймає участь в обміні кальцію в організмі, переводячи кальцій, що міститься в їжі, у лактат кальцію, який краще засвоюється організмом (що сприяє профілактиці рахіту у дітей). Препарат також приймає участь в утворенні вітамінів і розщепленні білків, з утворенням легкозасвоюваних амінокислот, у тому числі незамінних, що синтезуються організмом.

Показання. Препарат застосовувати з лікувальною та профілактичною метою дорослим і дітям (з перших місяців життя).

Лактобактерин-Біофарма показан:

- для профілактики розвитку та лікування порушень біоценозу кишечнику різної етіології;

- при акушерсько-гінекологічних процедурах, пов’язаних із санацією статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій та передпологовій підготовці вагітних групи ризику, з порушеннями чистоти вагінального секрету до III-IV ступеня.

Спосіб застосування та дози. Для розчинення препарату застосовувати кип'ячену воду кімнатної температури (20-25 ºС).

Спосіб розчинення:

1. У склянку налити воду з розрахунку 1 чайна ложка на 1 дозу препарату (кількість доз вказано на етикетці).

2. Для розчинення препарату частину води (1-2 чайні ложки) зі склянки перелити у флакон і збовтати. Препарат розчиняється не більше 5 хвилин, утворюючи гомогенну суміш з кисломолочним запахом.

3. Розчинений препарат з флакона перелити до склянки з залишком води і ретельно перемішати.

1 чайна ложка отриманого у склянці розчину становить 1 дозу препарату.

Термін придатності. 2 роки.

Умови зберігання. Зберігати у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 ºС.

Упаковка. По 2 або 3, або 5 доз у флаконі. По 10 флаконів у пачці. [23]

2.1.3. Антимікробна (захисна) закваска для сиру Lyofast LPR A.

Антимікробна закваска Lyofast LPR A на основі лактобактерій ***призначена*** для захисту твердих сирів під час визрівання.

Блокує розвиток цвілі, грибків та іншої небажаної мікрофлори. Містить тільки чисті культури молочнокислих лактобактерій.

Антимікробний ефект досягається природним способом без антибіотиків та інших хімічних добавок. Широко використовується в молочній промисловості, де дотримується контроль якості і відповідність міжнародним нормам ISO.

Зовнішній вигляд торгової упаковки наведено на рис. 2.3.

Рис. 2.3. - Зовнішній вигляд упаковки закваски Lyofast LPR A.

Переваги використання захисної культури LPR A:

- швидкий рост після внесення до таких продуктів: свіже молоко, ферментовані кисломолочні продукти, свіжі та напівтверді сири;
- відсутнє продукування газу;
- ведуть успішну боротьбу з небажаними мікроорганізмами, відбираючи у них живлення і тим самим перешкоджаючи їх розвитку внаслідок нестачі поживного субстрату;
- продукти зберігають свої первісні характеристики та якість протягом усього терміну зберігання;

Метод застосування біозахисної закваски заснований не на застосуванні хімічних речовин, а на чисто біологічному антагонізмі мікроорганізмів внаслідок утворення бактеріоцинів, що дозволяє пригнічувати розвиток багатьох видів небажаної мікрофлори, тим самим сприяє збільшенню термінів придатності.

Бактеріальний склад закваски:

Lactobacillus rhamnosus;

Lactobacillus plantarum.

Вид закваски: допоміжна. Використовують спільно з основною заквaскою як захисну культуру.

Виробник: компанія «Sacco», Італія.

Оптимальна температура для росту: 25-45 °С.

Кількість одиниць активності та вага: 10U. Вага закваски в пакеті може змінюватися від партії до партії (обумовлено фаговою альтернативністю партій). Об’єм молока, на який розрахований пакет, залишається незмінним.

Об'єм упаковки: 1 пакет сухої культури розрахований на переробку до 500 літрів молока.

Термін придатності: при температурі зберігання -18°С термін придатності, вказаний виробником, становить 18 календарних місяців.

Умови транспортування: культура упакована в герметичні саше-пакети, що виключають контакт із будь-яким живильним середовищем. Тому короткочасне порушення умов зберігання (транспортування при кімнатній температурі) терміном до 2х тижнів впливає на активність штаму. [31]

2.2. Методи досліджень.

В роботі використовували такі методи досліджень [1, 4, 32-34]:

- теоретичні методи скринінгу та аналізу літературних даних;
- приготування та забарвлення препаратів мікроорганізмів (по Граму);
- мікроскопіювання для ідентифікації мікробних культур;
- метод глибинного культивування лактобактерій на щільних та рідких живильних середовищах;
- метод прямого посіву для контролю мікробіологічної чистоти культури;
- метод десятикратних розведень з висівом на щільні живильні середовища глибинним чашковим методом для визначення кількості життєздатних клітин;

- титриметричний метод визначення активності кислотоутворення;
- потенціометричний метод визначення pH;
- спектрофотометричний метод визначення оптичної густини мікробної суспензії;
- Метод центрифугування для відділення біомаси від культуральної рідини

2.2.1. Метод ідентифікації пробіотичних мікроорганізмів

Визначення автентичності культури лактобактерій мікроскопіюванням здійснювали після окраски мазка широко застосовуваним складним методом за Грамом [33].

Проводили спостереження зафарбованих мікроорганізмів в мазках за допомогою світлового мікроскопа через об'єктив з позначенням сили збільшення 100Х. На фіксований пофарбований мазок на предметному склі додавали 1 краплю імерсійного масла та розглядали зовнішній вигляд мікроорганізмів через окуляр.

2.2.2. Визначення кількості живих бактерій методом десятикратних розведень з висівом на щільні живильні середовища глибинним чашковим методом

Випробування проводять, дотримуючись правил асептики. Схема проведення випробування методом десятикратних розведень наведена на рис. 2.4.

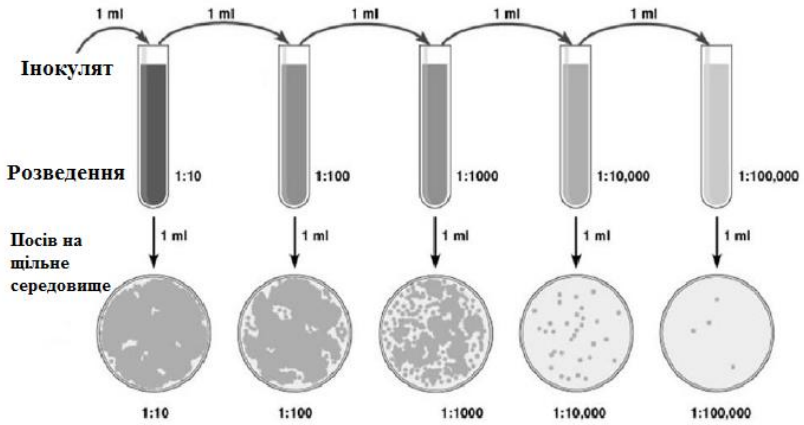


Рис. 2.4. Схема проведення випробування методом десятикратних розведень.

Методика проведення досліджень: 1 мл досліджуваного зразка (мікробна суспензія мутністю 0,5 за еталоном МакФарланда або суспензія препарату 1 доза/1мл) вносять піпеткою в пробірку, що містить 9 мл 0,9% розчину натрію хлориду (одержують розведення 10^{-1}). Вміст пробірки перемішують новою піпеткою (10-15 разів вбирати в неї та випускати суспензію клітин). Далі 1 мл першого розведення переносять в наступну пробірку, що містить 9 мл 0,9% розчину натрію хлориду – отримують друге розведення (10^{-2}). Таким чином отримують 8-10 розведень, кожен раз використовуючи нову піпетку. Кількість розведень залежить від кількості КУО в досліджуваному зразку.

У стерильну чашку Петрі вносять піпеткою посівний матеріал з двох останніх розведень в кількості по 1 мл на 2 чашки з кожного розведення. Додають в кожну чашку по 20-25 мл розплавленого та охолодженого до температури 42,5±2,5 ^{o}C агаризованого живильного середовища, закривають кришкою, та обертально-поступальними рухами перемішують таким чином, щоб середовище не потрапило на кришку та застигло після ретельного перемішування. Після застигання чашки інкубують у положенні «вгору дном» при температурі (37±1) ^{o}C протягом необхідного часу.

Облік результатів

Для обліку відбирають чашки, на яких виросло не менше 15 колоній. Колонії перелічують, помістивши чашку доверху дном на темному фоні, при необхідності використовують лупу х4-10. Колонії відмічають на дні чашки маркером. Середню арифметичну числа колоній перемножують на ступінь розведення. [1, 32]

2.2.3. Визначення активності кислотоутворення титриметричним методом.

Визначення засноване на титруванні кислот, що знаходяться в середовищі, розчином гідроксиду натрію. Точку еквівалентності встановлюють за допомогою індикатора.

Кислотність середовища виражають в градусах Тернера (^{o}T).

1^{o}Т відповідає 1 мл 0,1 М розчину NaOH, що пішов на нейтралізацію (титрування) суміші: на 10 мл досліджуваного середовища 20 мл води.

Методика

У колбу місткістю 100 мл відміряють 20 мл води очищеної та 10 мл аналізованого середовища, змішують і додають 2-3 краплі фенолфталеїну. Заповнюють бюретку титрантом - 0,1 М розчином гідроксиду натрію, та проводять титрування кожного зразку до появи слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає при перемішуванні протягом 30 с. Кількість лугу, яка пішла на титрування, визначають за поділками бюретки та розраховують кислотність за формулою:

$$Кислотність = \frac{V}{m} \times X \times 100$$

де V- кількість лугу, яка пішла на титрування, мл;

m - кількість мл зразку, що була взята для аналізу;

Х – поправка до титру 0,1 М розчину натрію гідроксиду;

100 - коефіцієнт для перерахунку в градуси Тернера.

2.2.4. Визначення активної кислотності потенціометричним методом

Водневий показник або pH - міра активності іонів водню в розчині, кількісно виражає його кислотність.

Вимірювання pH середовища зразків кисломолочних напоїв проводили потенціометричним методом, відповідно до вимог ДФУ, 2.2.3. та інструкції щодо користування pH-метром «pH-305». Цей прилад дозволяє вимірювати pH в більш широкому діапазоні і з більшою точністю (до 0,001 одиниці pH), ніж за допомогою індикаторів. Потенціометричний метод визначення pH грунтується на вимірі ЕРС гальванічного ланцюга, що включає спеціальний скляний електрод, потенціал якого залежить від концентрації іонів Н+ в навколишньому розчині та електрода порівняння - стандартного електрода з відомою величиною потенціалу.

Підготовка pH-метра і електродної системи та визначення активної кислотності (pH) проводиться згідно інструкцій, які додаються до приладу, та СОП № 4.001 Порядок роботи на pH-метрі «pH-305».

Рис. 2.5. pH-метр «pH-305».

2.2.5 Спектрофотометричний метод визначення оптичної густини мікробної суспензії

Визначення оптичної густини мікробної суспензії на спектрофотометрі ULAB 101. Цей прилад - аналітичний інструмент, який використовується для проведення якісного і кількісного аналізу дослідних зразків в найближчому ультрафіолетовому, видимому спектральному діапазоні. Використовується в таких областях, як медицина, клінічний огляд, біохімія, контроль якості, охорона навколишнього середовища тощо.

Порядок роботи.

1. Підключіть прилад до заземленої розетки. Увімкніть прилад. Дайте інструменту прогрітися протягом не менше 20 хвилин.
2. Приготуйте кювети з нульовим розчином або розчином порівняння (живильне середовище) та досліджуваною мікробною суспензією. Протріть кювети від відбитків пальців та крапель рідини фільтрувальним папером. Встановіть кювети в кюветотримач таким чином, щоб кювета з розчином порівняння була на шляху проходження світла (штовхніть ручку всередину).
3. Закрийте кришку кюветного відсіку.
4. Встановіть бажану довжину хвилі ручкою регулювання довжини хвилі, натисніть кнопку MODE, щоб вибрати «T».
5. Відкалібруйте прилад на 0 за розчином порівняння, натиснувши на кнопку ∇/ 0Abs / 100% T.

6. Витягніть тримач, щоб кювета з досліджуваним розчином була на шляху проходження світла. Встановіть показання. Для визначення оптичної густини микробної суспензії (значення Т) натисніть кнопку MODE, щоб змінити режим на "Т". Зчитайте результати безпосередньо на цифровому дисплеї.
7. Після закінчення вимірювань промийте кювети водою очищеною та висушіть їх на повітрі.
8. Прибор вимкніть та відключіть від розетки.

Рис. 2.5. Спектрофотометр ULAB 101.

2.2.6. Метод центрифугування для відділення біомаси від культуральної рідини

Для відділення біомаси від культуральної рідини використовують мето центрифугування, який здійснюють за допомогою лабораторної центрифуги ОПН-8. Це центрифуга періодичної дії, переносна, з частотою обертання до 8000 min^{-1}, яка застосовується для розділення неоднорідних рідких систем в полі відцентрових сил.

Рис. 2.5. Лабораторна центрифуга ОПн-8.

Перед роботою встановлюють центрифугу на рівну горизонтальну площину. Встановити в гнізда ротора пробірки, заповнені рідкою системою.

При неповному завантаженні центрифуги кожну пару наповнених пробірок розміщують в діаметрально протилежних гніздах ротора. При установці не закритих пробірок їх заповнюють на 75% максимального об’єму.

Закріплюють ротор на валу приводу за допомогою кришки ротора.

Порядок роботи.

1. Встановити ручкою годинникового механізму необхідний час центрифугування з урахуванням часу розгону.
2. Вимикач годин встановити в положення включено, при цьому на клавіші буде видна червона крапка.
3. Встановити ручкою частоти обертання ротора необхідне число обертів.
4. Вимикач ланцюга живлення встановити в становище «включено», при цьому на клавіші буде видна червона крапка
5. Ротор почне обертатися через деякий час (30-45 с) і автоматично досягне заданої частоти обертання.
6. Після закінчення заданого часу автоматично відключиться напруга живлення електродвигуна, і ротор почне зупинятися.
7. Після повної зупинки ротора відкрити кришку центрифуги, зняти кришку ротора і вийняти пробірки.
8. Відключити мережевий шнур центрифуги від мережі змінного струму.

Висновок до 2 розділу:

Були розглянуті характеристики кожного об’єкту з запропонованих нами для досліджень та описані методи для ідентифікації мікроорганізмів за культуральним та морфологічними ознаками, контролю мікробної чистоти зразків, визначення кількості життєздатних клітин, активної та титрованої кислотності, методики інструментальних досліджень.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Дослідження характеристик штаму *Lactobacillus plantarum UCM-2693*.

Перед проведенням досліджень контролювали автентичність штаму *Lactobacillus plantarum* UCM-2693 за культуральними та морфологічними ознаками.

Контроль морфологічних ознак.

Для контролю морфологічних ознак робили фіксований препарат з культури *Lactobacillus plantarum* UCM-2693 та фарбували його по Граму.

При мікроскопіюванні спостерігали наявність прямих паличок із закругленими кінцями, розташованих поодиноко або попарно, а також зібраних у ланцюжки різної довжини, зафарбованих у фіолетовий колір, тобто грампозитивних (рис. 3.1).

Рис. 3.1. Культура *Lactobacillus plantarum* UCM-2693 (окраска по Граму).

Цей опис відповідає характерним ознакам *Lactobacillus plantarum*, які наведено в розділі 2.

Контроль культуральних ознак.

Культуральні властивості характерні для кожного виду бактерій, тому вони є важливою диференціальною ознакою. Культуральні ознаки мікроорганізмів визначають характером їх росту на щільних, рідких та напіврідких живильних середовищах.

Для контролю культивували лактобактерії в рідкому середовищі МРС-1 та на поверхні щільного середовища МРС-4. Вирощування проводили при температурі 37 °С в термостаті протягом 72 годин.

Результати спостережень:

- рідке середовище МРС-1: наявна рівномірна каламуть та гомогенний білий осад на дні пробірки;
- напіврідке середовище МРС-2: наявні ізольовані колонії у вигляді тяжів;
- щільне середовище МРС-4: наявні опуклі, непрозорі, білі колонії (див. рис. 3.2).

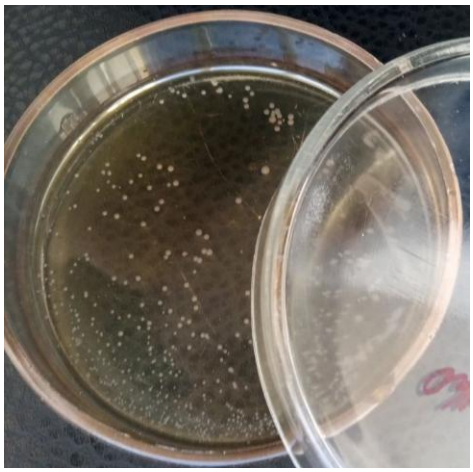


Рис. 3.2. Колонії *L. plantarum* UCM-2693 на середовищі МРС-4.

Ці ознаки відповідають характерним ознакам росту *Lactobacillus plantarum*, які наведено в розділі 2.

Досліджувана культура мала однорідні морфологічні та культуральні властивості без ознак дисоціації.

Контроль мікробіологічної чистоти.

Мікробіологічну чистоту культури *Lactobacillus plantarum* проводили методом прямого посіву, як описано в ДФУ 2.0, доп. 5, 2.6.36. Мікробіологічні випробування живих біотерапевтичних лікарських засобів: визначення числа забруднювальних мікроорганізмів. [34]

В одній дозі препарату повинні бути відсутні бактерії-контамінанти, дріжджові і цвілеві гриби в одиниці препарату (кат. 5.3. А, табл.1.).

Ступінь контамінації аеробними бактеріями визначали таким чином: готували мікробну суспензію з концентрацією за еталоном МакФарланда 0,5. 1 мл цієї суспензії переносили в пробірки з 9 мл 0,9% розчину натрію хлориду і перемішували 8-10 разів, отримуючи наступне розведення, тобто 10^{-1}. Потім проводили посів на чашки Петрі з МПа та з агаром Сабуро по 1 мл з вихідної суспензії і з розведення 10^{-1} на 2 чашки для кожного розведення.

Чашки з інокульованим середовищем МПА інкубували при температурі 37±1 ^{o}C (для визначення аеробних м/о), з інокульованим агаром Сабуро - при температурі 22±2 ^{o}C (для визначення дріжджових і цвілевих грибів) протягом 8 діб.

Через 72 години після початку інкубації посівів і остаточно через 8 діб не спостерігалося росту ані на чашках з МПа, ані на чашках з агаром Сабуро.

Контроль специфічної активності.

Вимоги до специфічної активності пробіотичних виробничих штамів та пробіотиків на їх основі стосуються визначення кількості живих бактерій, активністю кислотоутворення або їх антагоністичною активністю по відношенню до тест-штамів [1, 35].

Нами було визначено кількість живих бактерій в 1 мл мікробної суспензії з концентрацією за еталоном МакФарланда 0,5 (приблизно 10^{-9}) та активність кислотоутворення культури *Lactobacillus plantarum* відповідно до ДФУ 2.0, доп. 5. «Визначення специфічної активності пробіотиків» [34].

Кількість живих бактерій.

Кількість живих бактерій визначали методом десятикратних розведень з висівом на щільні живильні середовища глибинним чашковим методом. Вибір методу обумовлений тим, що лактобактерії є факультативними анаеробами та мікроаерофілами, тому цей спосіб для них є переважним.

Використовують тверде середовище МРС-4 (агаризоване). Воно містить твін-80 і сорбінову кислоту, використовується насамперед для культивування різних видів лактобактерії.

Методику проведення випробування описано в розділі ІІ.

Досліджуваний зразок готували за еталоном МакФарланда 0,5. Результати кількісного визначення мікроорганізмів виражали в колонієутворюючих одиницях (КУО).

Після інкубації на чашках, отриманих з розведення 10^{-7} було відмічено 231 та 242 колонії, на чашках з розведення 10^{-6} колоній було 23 та 26.

Середнє арифметичне для розведення 10^{-6} : (23 + 26): 2 = 24,5;

середнє арифметичне для розведення 10^{-7} : (231 + 242): 2 = 236,5.

Кількість живих бактерій в 1 дозі препарату складає:

$(24{,}5 \cdot 10^7 + 236{,}5 \cdot 10^6)$: 2 ·10 = 240750000 = $2{,}4 \cdot 10^9$.

Отже, кількість живих бактерій в 1 мл досліджуваного зразка складає $2{,}4 \cdot 10^8$.

Активність кислотоутворення.

Визначення проводили методом кислотно-основного титрування відповідно до ДФУ 2.0, доп. 5 «Визначення специфічної активності пробіотиків». [34]

Досліджуваний зразок готували за еталоном МакФарланда 0,5. По 1 мл отриманої суспензії вносили за допомогою піпетки до пробірок з 10 мл бульону МРС-1. Пробірки інкубували при температурі 37 ^oC протягом 48 год.

Методику проведення випробування описано в розділі ІІ.

Після закінчення терміну культивування проводили титрування мікробних суспензій з 2 пробірок, проводячи 2 паралельні проби.

Результати титрування та розрахунків величини активності кислотоутворення наведено в таблиці 3.1.

Показник активності кислотоутворення для культури *Lactobacillus plantarum* UCM-2693 виявився 233 ^oT.

3.2. Дослідження якості препарату «Лактобактерин-Біофарма».

Нами було проаналізовано сертифікат якості виробника на препарат «Лактобактерин-Біофарма». Вимоги АНД на препарат та результати контролю наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.1

Розрахунок величини активності кислотоутворення

№ з/п	Об'єм титранту, V, мл	Об'єм проби, m, мл	Коефіцієнт поправки для титранту, X	Кислотність, °T $\frac{V}{m} \times X \times 100$	∑ T
1	23,2	10	1,006	233,39	232,89
2	23,4			235,40	
3	23,1			232,39	
4	22,9			230,37	

Таблиця 3.2

Показники якості препарату «Лактобактерин-Біофарма» за сертифікатом виробника

№ з/п	Назва показника	Нормативні вимоги	Результати
1	2	3	4
1.	Опис	Кристалічна або пориста маса жовтувато-бежевого або білувато-сірого кольору зі специфічним запахом.	Пориста маса жовтувато-бежевого кольору
2.	Ідентифікація	У мазках, забарвлених по Граму повинні присутні грампозитивні прямі палички довжиною від 0,7 до 3,0 мкм, розташовані безладними скупченнями або окремими короткими ланцюжками. Підтверджується специфічною активністю.	Відповідає
3.	Час відновлення препарату	Не більше 5 хв. Відновлений препарат - гомогенна непрозора суспензія жовтувато-бежевого або білувато-сірого кольору	1 хв. Відновлений препарат - гомогенна непрозора суспензія жовтувато-бежевого кольору
4.	pH розчину	Від 4,5 до 6,5	5,44
5.	Втрата в масі при висушуванні	Не більше 3,5%	0,8 %

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4
6.	Специфічна нешкідливість	Повинен бути нешкідливим	Нешкідливий
7.	Відсутність сторонніх мікроорганізмів і грибів	Бактерії-контаминаты, дріжджові і цвілеві гриби повинні бути відсутні (Категорія 5.3.А)	Бактерії-контаминаты, дріжджові і цвілеві гриби відсутні
8.	Специфічна активність: Кількість живих бактерій в одній дозі Активність кислотоутворення	 Не менше $2x10^9$ живих лактобактерій Показник кислотоутворення не нижче 200 ° Т	 $2,2x10^9$ 245 °Т
9.	Упаковка	По 2 або 3 або 5 доз у флаконі, закупореному гумовою пробкою і обкатаному алюмінієвим ковпачком. По 10 флаконів з інструкцією для медичного застосування лікарського засобу в пачці (в коробці) з картону	5 доз у флаконі, закупореному гумовою пробкою і обкатаному алюмінієвим ковпачком. По 10 флаконів з інструкцією для медичного застосування лікарського засобу в пачці з картону
10.	Маркування	У відповідності з НД	
11.	Транспортування	При температурі від 2 до 8 °С	
12.	Зберігання	При температурі від 2 до 8 °	

За даними сертифікату, препарат відповідає вимогам АНД.

3.3. Дослідження якості антимікробної закваски для сиру Lyofast LPR A.

Нами було проаналізовано специфікацію виробника на антимікробну закваску для сиру Lyofast LPR A. Вимоги до закваски наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Специфікація закваски Lyofast LPR A

№ з/п	Назва показника	Характеристики та нормативні вимоги
1	**2**	**3**
1	Склад	Відібрані штами *Lactobacillus rhamnosus* та *Lactobacillus plantarum*.
2	Призначення	Захисна культура, що пригнічує рост плісняв та дріжджів. Застосовується у виробництві кисломолочних продуктів та сирів як нестартова культура молочнокислої бактерії. Культура забезпечує слабку кислотність та аромат при повільній цитратній ферментації.
3	Застосування	Вносять суху заквасочну культуру безпосередньо в молоко, що переробляється, при дотриманні стерильних умов. Поступово розподіляють культуру шляхом легкого перемішування.
4	Рекомендації щодо внесення	1 доза дорівнює 10^{11} КУО; при внесенні в 100 літрів молока 1 доза утворює приблизно 10^6 КУО/мл молока. Дані отримані за стандартних лабораторних умов
5	Технічна інформація:	
5.1	Оптимальна температура для росту	25-45 °С
5.2	Утворення аромату	+++
5.3	Захисний вплив	при 4-10 °С
6	Мікробіологічні дані:	
6.1	Bacillus cereus	<100 КУО/г (метод М10 за ISO 7932)
6.2	Коагуляза-позитивні стафілококи*	<10 КУО/г (метод М11 за ISO 6888-1-2)
6.3	Ентеробактерії	<10 КУО/г (метод М02 за ISO 21528-1-2-3)
6.4	Escherichia coli	<1 КУО/г (метод М27 за ISO 11866-1-2/IDF 170)
6.5	Listeria monocytogenes*	Не виявлено у 25 г (метод М13 за ISO 11290-1-2)

Продовження таблиці 3.3

1	2	3
6.6	Грибки та дріжджі	<10 КУО/г М03 (ISO 6611/IDF 94)
6.7	Salmonella spp.*	Не виявлено у 25 г (метод М12 за ISO 6785/IDF 93)
7	Інформація про безпеку:	
7.1	Важкі метали*, ppm	Pb (свинець) <1 Hg (ртуть) <0.03 Cd (кадмій) <0.1
7.2	Паспорт безпеки	Даний продукт не є шкідливим, тому надання Паспорта безпеки не є обов'язковим
7.3	ГМО	Організми SACCO не є генетично модифікованими (ГМО) відповідно з Директивою ЄС 2001/18/ЄС. Цей продукт не вимагає маркування щодо використання ГМО відповідно з Директивою (ЄС) №1829/2003 та Директивою (ЄС) №1830/2003.
7.4	Алергени	Усі сировинні матеріали не містять таких компонентів та їх похідних: зернові, що містять глютен, ракоподібні, яйця, риба, арахіс, соя, горіхи, селера, гірчиця, насіння кунжуту, діоксид сірки, люпин та молюски. Цей продукт містить МОЛОКО. Список алергенів відповідає Директиві (ЄС) №1169/2011.
7.5	BSE/TSE статус	Цей продукт вважається безпечним щодо передачі губчастої енцефалопатії ВРХ (BSE) або трансмісивних губчастих енцефалопатій (TSEs) відповідно до Директиви ЕМА №410/10 Редакція 3.
8	Додаткова інформація	
8.1	Барвники	Цей продукт не містить доданих барвників відповідно до Директивою ЄС №1333/2008.
8.2	Інформація про упаковці	Закваски сублімаційного сушіння упаковують у водо- та повітронепроникні пакети, містять три шари (у порядку зовні всередину): поліестер, алюміній, поліетилен. Пакувальний матеріал є харчовим
8.3	Зберігання та термін придатності	Закваски зберігають при температурі -18°C (-0,4°F) або нижче. За даних умов та в оригінальній запечатаній упаковці термін придатності продукту складає 18 місяців.
9	Сертифікація	
9.1	Загальна	Компанія Sacco S.r.L. сертифікована за системою ISO 22000:2005 та FSSC 22000 з 2014 року.

* - Аналізується на регулярній основі

За характеристиками та параметрами, які контролюють в продукті, закваска задовольняє вимогам до об'єктів цього дослідження.

Для підтвердження якості закваски було проведено її контроль за показниками: автентичність лактобактерій за культуральними та морфологічними ознаками, мікробіологічна чистота культури, специфічна активність.

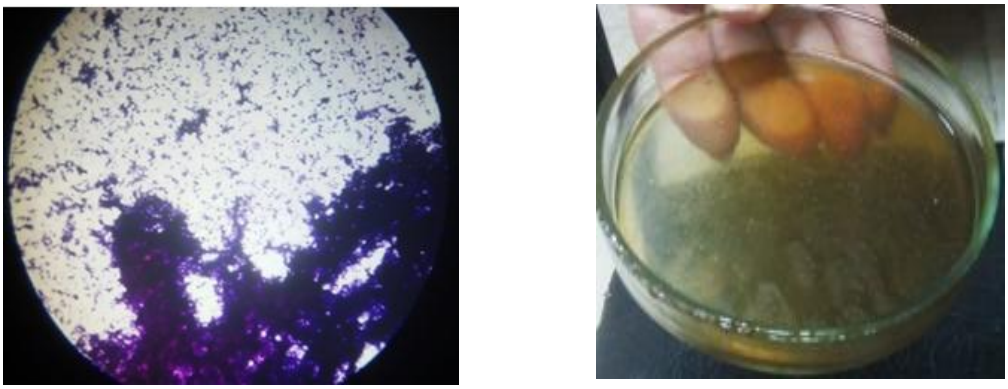
Приготування проб. За даними НД в упаковці міститься 10 доз закваски, 1 доза містить 10^{11} КУО. Вміст пакетика в асептичних умовах зважили на аналітичних вагах та відібрали наважки по 1 дозі.

Далі готували проби з розрахунку на 1 дозу 1 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Розведення готували з розрахунку 0,5 мл вихідної суспензії на 4,5 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Далі проводили випробування, як описано в розділі 2 та в розділі 3.1. Результати випробувань наведено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Результати випробувань закваски Lyofast LPR A

№ з/п	Назва показника	Нормативні вимоги	Результати
1.	Культуральні ознаки	МРС-1: рівномірна каламуть та гомогенний білий осад на дні пробірки; МРС-4: опуклі, непрозорі, білі колонії	відповідають характерним ознакам росту *Lactobacillus plantarum* (рис. 3.3, А)
2.	Морфологічні ознаки	наявність прямих паличок із закругленими кінцями, розташованих поодиноко або попарно, а також зібраних у ланцюжки різної довжини, зафарбованих у фіолетовий колір	відповідають характерним ознакам росту *Lactobacillus plantarum* (рис. 3.3, Б)
3.	Мікробіологічна чистота культури	Див. специфікацію (табл. 3.3)	не спостерігалося росту на МПа, та на агарі Сабуро
4.	Кількість живих бактерій в одній дозі	10^{11} КУО/доза (див. специфікацію (табл. 3.3))	$2{,}2 \cdot 10^{11}$ КУО/доза
5.	Активність кислотоутворення	Не нижче 200 °Т (для лактобактерій)	238 °Т



А Б

Рис. 3.3 Морфологічні (А) та культуральні (Б) дослідження закваски Lyofast LPR A.

За результатами досліджень було експериментально встановлено відповідність культури *Lactobacillus plantarum* UCM-2693 та закваски Lyofast LPR A культуральним та морфологічним ознакам лактобактерій заявлених видів, виявлено відсутність сторонніх мікроорганізмів (встановлено мікробіологічну чистоту), підтверджено наявність належного числа живих бактерій і достатній рівень активності кислотоутворення (показник «специфічна активність»). Також теоретично за даними сертифікату виробника було встановлено відповідність наявної серії препарату «Лактобактерин-Біофарма» вимогам АНД. Ці результати є підставою для висновку про придатність досліджуваних об’єктів для проведення досліджень.

3.4 Отримання екзометаболітного комплексу лактобактерій.

Для отримання екзометаболітного комплексу штаму *Lactobacillus plantarum* UCM-2693 проводили його культивування на рідкому середовищі МРС-1.

Готували мікробну суспензію з добової культури бактерій на поверхні скошеного агару в пробірці. Для цього в стерильну пробірку вносили 3-5 мл розчину натрію хлориду 0,9%, стерильною бактеріальної петлею відбирали 5-10 колоній бактерій з поверхні скошеного агару в пробірці, вносили їх у пробірку з розчином натрію хлориду 0,9% та суспендували, обертаючи

пробірку між долонями. Порівнювали каламутність отриманої мікробної суспензії з каламутністю оптичного стандарту на 0,5 од. за МакФарландом. При необхідності розводили суспензію розчином натрію хлориду 0,9% до досягнення каламутності оптичного стандарту.

10 мл отриманої суспензії вносили в пляшку з 100 мл стерильного середовища МРС-1, дотримуючись правил асептики.

Культивування проводили при температурі 37 °С протягом 72 годин.

Після закінчення інкубації проводили розділення культуральної рідини та біомаси на лабораторній центрифузі ОПН-8 зі швидкістю 5000 об/хв протягом 5 хв.

Далі супернатант (культуральна рідина з екзометаболітами) декантували з осаду та в асептичних умовах фільтрували через мембрани «Мілліпор» з рейтингом пор 0,8 мкм (попередня фільтрація) та 0,2 мкм (стерилізуючи фільтрація) в стерильні флакони.

Вимірювали pH отриманого екзометаболітного комплексу потенціометрично. pH 4,55±0,02.

3.5. Дослідження бактеріотропної дії ЕК лактобактерій.

Досліджували бактеріотропну дію екзометаболітного комплексу штаму *Lactobacillus plantarum* UCM-2693. Для цього культивували в його присутності монокультуру штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (препарат «Лактобактерин») та суміш клітин штамів *Lactobacillus rhamnosus* та *Lactobacillus plantarum* (закваска «Lyofast LPR A»). Для виявлення бактеріотропної дії досліджували активність кислотоутворення та накопичення біомаси при культивуванні.

Метою було дослідження впливу екзометаболітного комплексу на розвиток лактобактерій аналогічного виду та іншого (*L. rhamnosus)*.

Рідкі культури лактобактерій отримували шляхом регідратації препарату «Лактобактерин» та закваски «Lyofast LPR A» в співвідношенні 1 доза на 5 мл 0,9% стерильного розчину натрію хлориду.

Для визначення впливу метаболічної композиції на рост клітин 10 мл метабіотика і такий же об'єм культури лактобактерій вносили в 80 мл 0,5% стерильного розчину глюкози і витримували в термостаті при температурі 37±1 °С протягом 68 год.

У контрольні пробірки вносили 80 мл 0,5% розчину глюкози, 10 мл розчину 0,9% натрію хлориду, 10 мл культури лактобактерій.

Під час усього циклу вирощування через певні проміжки часу відбиралися зразки для визначення концентрації бактерій, оптичної густини суспензії та кислотності.

Кількісний облік лактобактерій проводили методом послідовних розведень з висівом в живильне середовище глибинним чашковим методом, динаміку мікробного росту за оптичною густиною спектрофотометричним методом при довжині хвилі 600 нм (методики див. в розділі 2).

Оптична щільність, виміряна при 600 нм, відображає концентрацію клітин у середовищі. Оптичну густину культури при 600 нм визначає ефект світлорозсіювання. Світлорозсіювання, у свою чергу, прямо пропорційне концентрації клітин у середовищі.

Кислотність визначали титриметрично та потенціометрично (методики див. в розділі 2).

Результати досліджень наведено в таблицях 3.5.-3.7.

Таблиця 3.5

Динаміка мікробного росту лактобактерій (Лактобактерин)

Тривалість культивування, год	***Контрольний зразок***			***Зразок з 10 % ЕК***		
	Кількість КУО/мл	***lg***	***Оптична густина***	***Кількість КУО/мл***	***lg***	***Оптична густина***
0 (вихідні дані)	$4{,}4 \times 10^8$	8,64	0,210±0,005	$4{,}4 \times 10^8$	8,64	0,210±0,005
8	$5{,}3 \times 10^8$	8,72	0,252±0,008	$6{,}7 \times 10^8$	8,83	0,274±0,012
20	$8{,}7 \times 10^8$	8,94	0,329±0,015	$1{,}5 \times 10^9$	9,18	0,438±0,006
28	$1{,}1 \times 10^9$	9,04	0,382±0,005	$4{,}4 \times 10^9$	9,64	0,498±0,014
40	$1{,}5 \times 10^9$	9,18	0,431±0,005	$5{,}1 \times 10^9$	9,71	0,721±0,002
48	$2{,}3 \times 10^9$	9,36	0,533±0,012	$6{,}2 \times 10^9$	9,79	0,933±0,005
60	$2{,}6 \times 10^9$	9,42	0,533±0,005	$6{,}3 \times 10^9$	9,80	0,935±0,005
68	$2{,}4 \times 10^9$	9,38	0,536±0,005	$6{,}3 \times 10^9$	9,80	0,937±0,005

Таблиця 3.6

Динаміка мікробного росту лактобактерій (закваска «Lyofast LPR A»)

Тривалість культивування, год	***Контрольний зразок***			***Зразок з 10 % ЕК***		
	Кількість КУО/мл	***lg***	***Оптична густина***	***Кількість КУО/мл***	***lg***	***Оптична густина***
0 (вихідні дані)	$1{,}1x10^{10}$	10,04	0,250±0,005	$1{,}1x10^{10}$	10,04	0,250±0,010
8	$1{,}4\ x10^{10}$	10,15	0,271±0,007	$2{,}1x10^{10}$	10,33	0,353±0,012
20	$5{,}9\ x10^{10}$	10,77	0,358±0,007	$1{,}2x10^{11}$	11,07	0,464±0,015
28	$1{,}7x10^{11}$	11,23	0,427±0,025	$3{,}5x10^{11}$	11,55	0,576±0,008
40	$2{,}8x10^{11}$	11,45	0,541±0,015	$5{,}5x10^{11}$	11,74	0,843±0,007
48	$4{,}2x10^{11}$	11,62	0,628±0,005	$8{,}2x10^{11}$	11,91	1,043±0,010
60	$4{,}1x10^{11}$	11,61	0,622±0,005	$8{,}3x10^{11}$	11,92	1,040±0,005
68	$4{,}1x10^{11}$	11,61	0,621±0,005	$8{,}2x10^{11}$	11,91	1,040±0,005

Примітка. n=3.

Таблиця 3.7.

Динаміка зміни кислотності середовища культивування

Тривалість культивування, год	***Кислотність активна (pH), титрована (°T)***							
	Лактобактерин				***Закваска «Lyofast LPR A»***			
	Контрольний зразок		***Зразок з 10 % ЕК***		***Контрольний зразок***		***Зразок з 10 % ЕК***	
	pH	°T	pH	°T	pH	°T	pH	°T
1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	5,54±0,02	38	5,42±0,01	35	5,73±0,01	29	5,65±0,01	32
8	5,41±0,05	55	5,29±0,05	66	5,42±0,05	60	5,37±0,05	72
20	4,65±0,03	69	4,05±0,03	127	4,74±0,03	72	4,30±0,03	143
28	4,51±0,02	136	3,60±0,02	176	4,69±0,02	145	4,02±0,02	193
40	4,45±0,02	187	3,49±0,02	231	4,69±0,02	197	3,89±0,02	260
48	4,44±0,03	245	3,48±0,01	267	4,67±0,02	238	3,74±0,01	261
60	4,41±0,03	245	3,47±0,01	268	4,67±0,02	235	3,72±0,01	260
68	4,41±0,02	244	3,47±0,01	267	4,65±0,02	237	3,74±0,01	261

Для наочного відображення отриманих результатів було побудовано графіки залежності змін кількості біомаси та кислотності середовища протягом культивування, які наведено на рис. 3.1.-3.3.

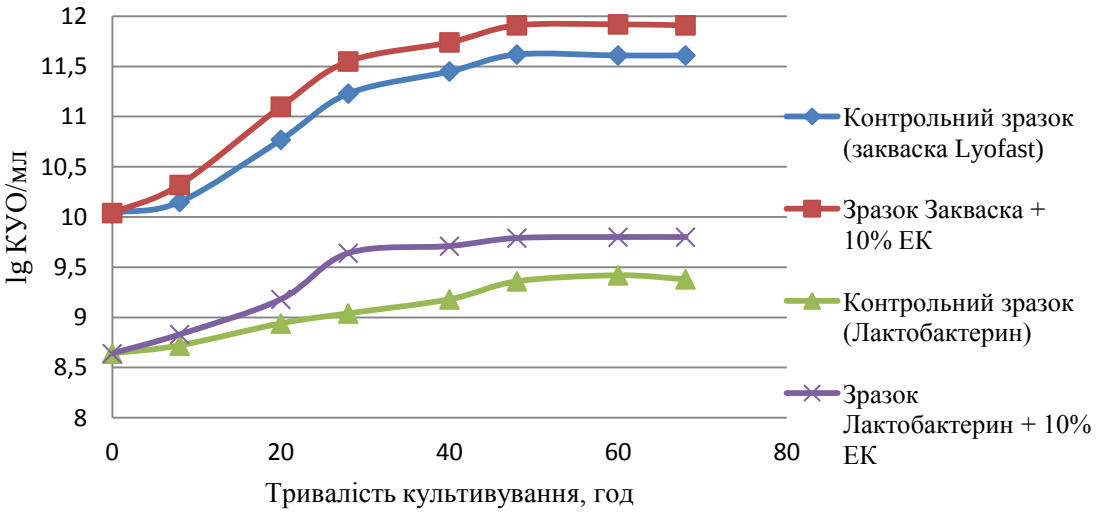


Рис. 3.1. Динаміка росту біомаси лактобактерій в залежності від тривалості культивування.

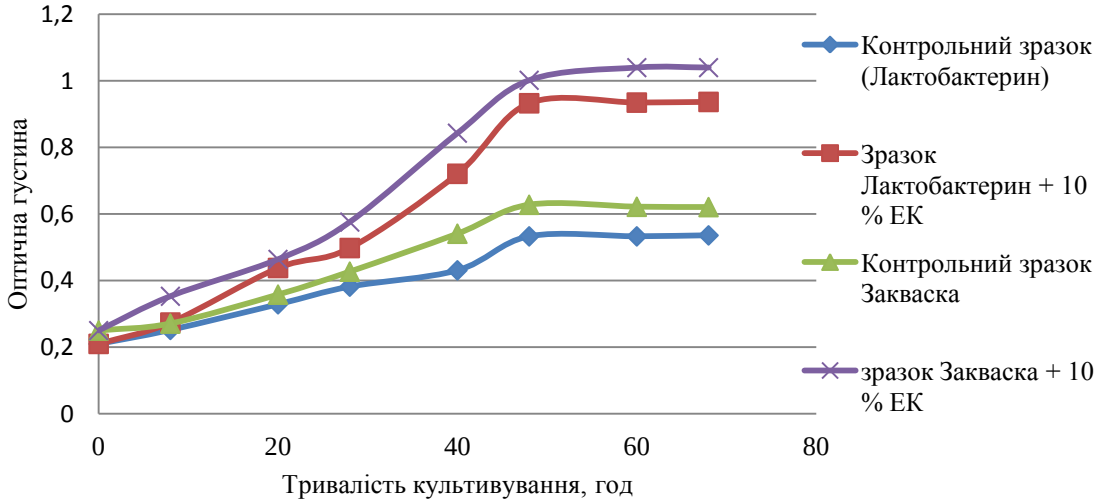


Рис. 3.2. Динаміка змін оптичної густини біомаси лактобактерій в залежності від тривалості культивування.

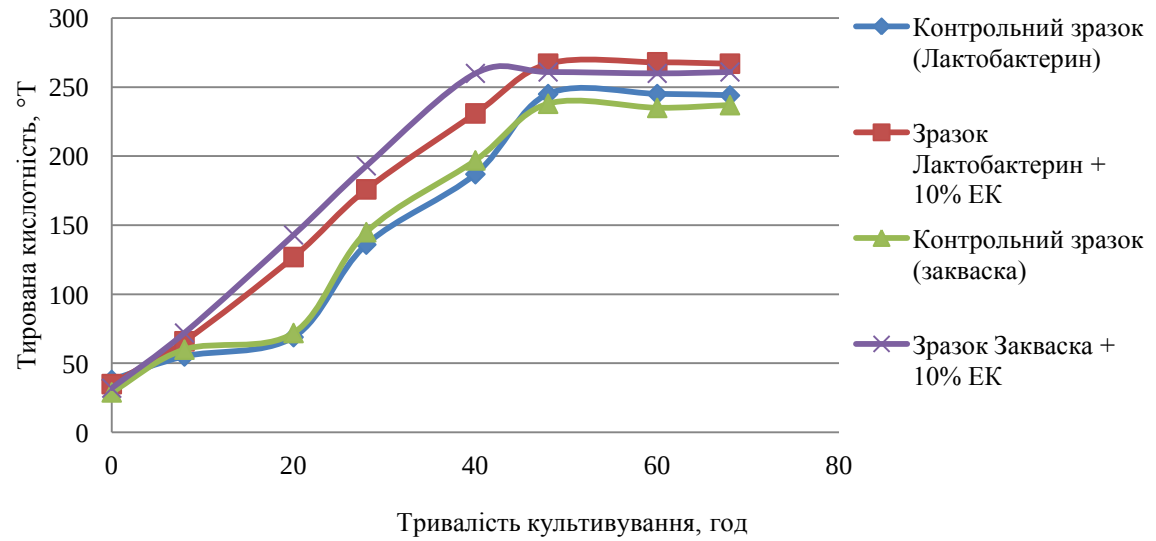


Рис. 3.3. Динаміка зміни титрованої кислотності в середовищі культивування.

3.6. Аналіз результатів досліджень бактеріотропної дії екзометаболітного комплексу (ЕК).

Аналіз даних щодо росту біомаси культури лактобактерій в зразках, отриманих з препарату «Лактобактерин» (*L. plantarum* 8Р-А3) та закваски «Lyofast LPR A» (*L. plantarum* та *L. rhamnosus)*, під час культивування в середовищі з додаванням 10 % екзометаболітного комплексу, отриманого при культивуванні штаму *L. plantarum* UCM-2693, та в середовищі без додавання екзометаболітів (контрольні зразки) виявив таке:

- додавання екзометаболітного комплексу до середовища культивування надає стимулюючого впливу - кількість життєздатних клітин, яку визначали методом послідовних розведень, після 24 годин культивування в обох зразках ставала більшою, ніж у вихідній суспензії, та значно вище, ніж в контрольній;
- порівняння кривих росту культури на рис. 3.1, показало, що внесення комплексу метаболітів скорочує лаг-фазу, ділянка лог-фази стає крутішою, та раніше настає стаціонарна фаза, що дає змогу скоротити тривалість культивування при накопиченні більшої кількості біомаси;
- порівняння кривих на рис. 3.1 та 3.2, які відображають рост мікробної маси та які побудовані за даними, отриманими мікроскопічним та інструментальним методами, виявив їх схожість, що дає змогу використовувати для досліджень спектрофотометричной метод, як більш зручний та швидкий;
- аналіз кривих на рис. 3.3 підтверджує зроблені висновки. Наявне активізування кислотоутворення, що свідчить про більш високу специфічну активність лактобактерій при культивуванні з додаванням до середовища екзометаболітного комплексу.

Загальні візуальні порівняння не дають кількісного уявлення про зміни, тому що вихідні концентрації та якісний склад лактобактерій дещо відрізнялися. Тому для об’єктивного кількісного порівняння змін нами було

розраховано відносні величини стосовно динаміки росту біомаси та кислотності.

Розраховували окремо коефіцієнт стимуляції (КС) за показниками оптичної густини (КС росту) та за показниками кислотності (КС кислотоутворення) з використанням формули:

$$КС = \frac{Дк - Дп}{Кк - Кп}$$

де Дк – середній кінцевий показник у дослідній пробі;

Дп - середній початковий показник у дослідній пробі;

Кк - середній кінцевий показник у контрольній пробі;

Кп – середній початковий показник у контрольній пробі.

Результати розрахунку коефіцієнтів наведено в табл. 3.8 та 3.9.

Отже, тепер можна порівняти стимулюючий вплив на накопичення біомаси для двох зразків.

Коефіцієнт стимуляції росту (КСросту) в обох випадках перевищував 2, але більшим виявився для зразку з Лактобактерином. Це підтверджує і кратність початкових та кінцевих показників.

Коефіцієнт стимуляції кислотоутворення (КСкис) в обох випадках перевищував 1, але більшим виявився знов для зразку з Лактобактерином. Це підтверджує і кратність початкових та кінцевих показників.

Аналіз результатів досліджень бактеріотропної дії екзометаболітного комплексу (ЕК) лактобактерій однозначно виявив наявність стимулюючого ефекту на рост лактобактерій.

Дещо менші показники для зразків з закваскою можна пояснити тим, що концентрація клітин в них була вищою при однаковій концентрації глюкози, отже цей субстрат міг надавати обмежуючий вплив на розвиток бактерій. Середовище перетворилося на «голодне» швидше, ніж у випадку з «Лактобактерином».

Таблиця 3.8.

Вплив метаболітних комплексів на зростання біомаси лактобактерій

Досліджуваний зразок	*Оптична густина, А*		*Коефіці-єнт стимуляції росту (КСросту)*	*Крат-ність показників (Дк/Дп, Кк/Кп)*
	Почат-ковий показник	*Показник після інкубації*		
1	2	3	4	5
Контрольний зразок (Лактобактерин)	0,210	0,533	2,24	2,54
Зразок Лактобактерин + 10 % ЕК	0,210	0,933		4,44
Контрольний зразок (Закваска)	0,250	0,628	2,10	2,51
Зразок Закваска + 10 % ЕК	0,250	1,043		4,17

Таблиця 3.9.

Вплив метаболітних комплексів на активність кислотоутворення лактобактерій

Досліджуваний зразок	*Титрована кислотність, °Т*		*Коефіці-єнт стимуляції кислото-утворення (КСкис)*	*Крат-ність показників (Дк/Дп, Кк/Кп)*
	Почат-ковий показник	*Показник після інкубації*		
1	2	3	4	5
Контрольний зразок (Лактобактерин)	38	245	1,12	6,4
Зразок Лактобактерин + 10 % ЕК	35	267		7,6
Контрольний зразок (Закваска)	29	238	1,10	8,2
Зразок Закваска + 10 % ЕК	32	261		8,2

3.7. Перспективні напрямки та пропозиції до подальших досліджень.

Отримані експериментальні результати є доказом доцільності проведених досліджень та підґрунтям для їх продовження за кількома напрямками.

1. *Пропозиції з практичного застосування стимулюючої дії екзометаболітних комплексов.*

Завдяки додаванню до середовища ферментації комплексу екзометаболітів, молочнокислі бактерії почали активніше розмножуватися, що можна використовувати для підвищення продуктивності виробничих процесів отримання біомаси лактобактерій, які використовують як основні діючі речовини профілактичних та лікувальних лікарських засобів та добавок дієтичних, а також в інших галузях, зокрема у виробництві заквасок для молокопереробної промисловості.

2. *Розробка технологічних параметрів отримання та використання метаболітних комплексів.*

В цьому напрямку роботи можуть бути спрямовані на визначення оптимальних параметрів отримання нативних метаболітних комплексів пробіотичних бактерій, способів їх очистки (центрифугування, ультрафільтрація, виснажлива фільтрація, діаліз та їх комбінації), оптимальних кількостей додавання їх до складу живильних середовищ для отримання біомаси лакто- та інших пробіотичних бактерій.

3. *Дослідження антагоністичних властивостей метаболітних комплексів.*

Добре відомий антимікробний потенціал лактобацил. Він обумовлений утворенням за певних умов молочної кислоти, а також інших антимікробних та антибіотикоподібних сполук. Експериментами *in vitro* та *in vivo* доведено, що спектр антимікробної активності метаболітів лактобацил *L. plantarum* 8P-A3, що поширюється на багато збудників кишкових інфекцій, може бути розширений, зокрема, стосовно збудників псевдотуберкульозу та кишкового ієрсиніозу.

Антагоністична активність молочнокислих бактерій складається з дії продукованих ними бактеріоцинів, а також кислот (молочної, оцтової, мурашиної і т.д.), спиртів, перекисів та інших метаболітів, що накопичуються ними в процесі їх росту і розвитку.

Тому не викликає сумнівів перспективність дослідження антагоністичних властивостей екзометаболітних сумішей різних штамів пробіотичних бактерій. Це буде підставою для створення препаратів на основі біологічно активних екзометаболітів, що продукуються клітинами лактобактерій, які є складовою нормальної мікрофлори, для забезпечення стану нормобіозу в різних біотопах організму господаря та, відповідно, його повноцінної життєдіяльності.

4. Дослідження складу метаболітних комплексів.

Встановлено, що поряд з основним компонентом культуральної рідини лактобактерій – молочною кислотою, на частку якої припадає 70% від загальної кількості метаболітів, в ній присутні солі фосфорної кислоти (14%), а також амінокислоти, карбонові кислоти, жирні кислоти, багатоатомні спирти, цукри та полісахариди, які у сумі складають до 16% від загальної кількості метаболітів. [37]

Важливим напрямком є вивчення якісного та кількісного складу екзометаболітних сумішей в залежності від штаму-продуценту, умов та параметрів культивування. Це має важливе значення для відпрацювання біотехнологічного процесу виділення мікробних метаболітів та отримання на їх основі продуктів різного призначення, насамперед медичного та харчового.

5. Перспективність препаратів-метабіотиків

Екзометаболіти лактобактерій, хоча й не є спеціалізованими факторами антагонізму, але надають таку дію, стимулюють розвиток представників нормобіоти та , за даними літератури, здатні брати участь в обміні речовин, підтримувати водно-електролітний баланс у кишечнику, бути джерелом харчування для клітин епітелію, надавати антиканцерогенну та антимутагенну дію, впливати на імунний статус та роботу різних органів та систем макроорганізму.

З урахуванням цих доведених вченими фактів можна стверджувати, що настає нове розуміння концепції пробіотикотерапії або її природний розвиток. Створювані з допомогою пробіотиків біологічно активні сполуки,

які отримали назву «метабіотики», «постбіотики» та ін., з відомою структурою, будуть мати здатність, з одного боку, пригнічувати розвиток у кишечнику патогенних бактерій, а з іншого боку – ефективно стимулювати розмноження індигенної мікрофлори кишечника. І, можливо, майбутні метабіотики виявляться більш ефективними у профілактиці та лікуванні мікроекологічних порушень кишечника, ніж традиційно використовувані протягом тривалого часу пробіотики [3, 20, 21, 37].

До їх переваг, крім більшого терапевтичного потенціалу, відносять високу біодоступність, відсутність конфлікту з власною мікробіотою макроорганізму, відсутність латентного періоду для реалізації біологічного ефекту, безпека, вищі споживчі властивості лікарських форм та терміни придатності.

6. *Дослідження здатності лактобактерій продукувати екзополісахариди*

Серед численних речовин – метаболітів бактерій особливе місце посідають вуглеводи та їх похідні, які виконують роль джерела енергії, регуляторів специфічних біохімічних процесів. Багато мікроорганізмів є джерелом отримання екзополісахаридів (ЕПС). Їх синтезують і багато видів молочнокислих бактерій. Вивчення ЕПС, продукованих молочнокислими бактеріями, активно розвивається в даний час. [38, 39]

За даними дослідників кількість продукованих лактобактеріями ЕПС може варіювати у молочнокислих стрептококів від 50 до 350 мг/л, у болгарської палички - від 60 до 150 мг/л. Встановлено, що 60-70% штамів, що утворюють в'язкі молочні згустки, продукували більшу кількість ЕПС.

Дослідженнями вчених також було доведено, що екзогенні вуглеводи:

- виконують функцію саморегуляторів процесів росту та розвитку заквасочних консорціумів, що важливе для харчової промисловості:
- виступають у ролі факторів, що сприяють адгезії корисних мікроорганізмів на стінках кишківника. Характеризуючись аніонною природою, ЕПС виявляють сорбуючу здатність по відношенню до

токсичних елементів. Це вже важливе для застосування в фармацевтиці [38, 39].

Синтез ЕПС є одним з еволюційно вироблених механізмів адаптації мікроорганізмів до змін навколишнього середовища, у відповідь на екстремальні умови культивування, що виходять за межі толерантності для виду. Приріст ЕПС розглядають як стресову відповідь мікробного консорціуму на зміни pH і температури середовища. Протекторні властивості ЕПС грають захисну роль і забезпечують існування як продуцента, так і інших представників мікрофлори. [38, 39].

Тому дуже цікавим напрямком є дослідження наявності та кількості ЕПС в метаболітних комплексах, залежність їх утворення від умов культивування.

Розробка технологій отримання метаболітних комплексів з підвищеним вмістом ЕПС дозволить отримати, з одного боку, неклітинні пробіотичні засоби з розширеним спектром дії, а з іншого боку, має шляхи застосування при отриманні молочнокислих продуктів - як закваски з новими властивостями, природні неклітинні добавки до заквасочних консорціумів, які є стартовими та захисними препаратами, тощо.

Мікробні ЕПС знаходять застосування у ветеринарії, медицині, фармацевтичній, харчовій, хімічній, нафтовидобувній та інших галузях, оскільки мають широкий спектр фізико-хімічних, функціонально-технологічних і біологічних властивостей.

Це підтверджує доцільність, актуальність та перспективність проведення подальших робіт з дослідження метаболітних комплексів пробіотичних бактерій, використання їх як стимуляторів накопичення біомаси, для створення препаратів-метабіотиків з варіабельністю біологічних властивостей та спеціалізованих для профілактики та корекції різних патологічних станів в медицині, а також для удосконалення складу заквасок з різним призначенням для молочнокислих продуктів.

Висновок до 3 розділу:

В розділі обґрунтовано вибір компонентів для дослідження бактеріотропної дії екзометаболітного комплексу лактобактерій. Наведено результати теоретичних та експериментальних контролів якості об’єктів досліджень, досліджень динаміки росту біомаси та кислоутворення протягом культивування в зразках, які містять один вид лактобактерій та їх суміш. Встановлено стимулюючий вплив метаболітної композиції культуральної рідини лактобактерій на динаміку змін активної та титрованої кислотності, збільшення біомаси. Проведено порівняльний аналіз результатів досліджень та обговорені перспективні напрямки подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Розглянуті види та властивості лактобактерій та описані їх функції в організмі людини, відмічені джерела пробіотиків у раціоні людини, проаналізовані взаємовідносини макроорганізму з пробіотичною мікрофлорою - лакто- та біфідобактеріями. Розглянуто види препаратів профілактичного та лікувального призначення на основі пробіотичних мікроорганізмів. Обгрунтовано перспективність досліджень екзометаболітних комплексів лактобактерій для отримання препаратів-метабіотиків та удосконалення інших продуктів на основі пробіотичних мікроорганізмів.
2. Визначені об’єкти досліджень, вивчено їх морфологічні, культуральні ознаки, проконтрольовано ряд показників якості.
3. Отримано екзометаболітний комплекс, утворений при культивуванні штаму *L. plantarum* UCM-2693 в середовищі МРС-1 та відділений від біомаси центрифугуванням.
4. Проаналізовано та обрано методи досліджень для вивчення бактеріотропної дії: метод десятикратних розведень з висівом на щільні живильні середовища глибинним чашковим методом, титриметричний та потенціометричний методи визначення активності кислотоутворення, спектрофотометричний метод визначення оптичної густини мікробної суспензії.
5. Досліджено вплив додавання 10 % метаболітного комплексу в середовище культивування лактобактерій з «Лактобактерину» та закваски «Lyofast LPR A». Аналіз отриманих результатів однозначно виявив наявність стимулюючого ефекту: кількість життєздатних клітин після 24 год. культивування була більшою, ніж у вихідній суспензії, та значно вище, ніж в контрольній, скорочувалася лаг-фаза, ділянка лог-фази ставала крутішою, стаціонарна фаза наставала раніше, що дає змогу скоротити тривалість культивування, активізування кислотоутворення

свідчить про більш високу специфічну активність лактобактерій при культивуванні з додаванням екзометаболітного комплексу.

6. Проведено порівняльний аналіз результатів досліджень впливу екзометаболітного комплексу на лактобактерії препарату «Лактобактерин» та закваски «Lyofast LPR A» шляхом розрахунку відносних величин - коефіцієнтів стимуляції росту та стимуляції кислотоутворення, які виявили порівняность бактеріотропного ефекту для обох об’єктів, з незначною перевагою для Лактобактерину.
7. На основі отриманої інформації розглянуто перспективні напрямки та пропозиції до подальших досліджень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Старовойтова С.О. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – Київ: НУХТ, 2012. – 318 с.
2. Мікробіологічні аспекти пробіотичних препаратів / А.В. Крисенко та ін. // Вісн. Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. 2010. Вип. 18, т. 2. С. 19–24.
3. Altveş, S., Yildiz, H. K., & Vural, H. C. (2020). Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. Bioscience of microbiota, food and health, 39(2), 23–32. https://doi.org/10.12938/bmfh.19-023
4. Flourie B. M. Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date. London:Cochrane, 2007. 166 c.
5. Probiotic Effects on Cold & Influenza-Like Symptom Incidence and Duration in Children / Gregory J. L. et al. // Pediatrics. 2009. Aug;124(2). P. 172-179. doi: 10.1542/peds.2008-2666.
6. Probiotic Characteristics and Health Benefits of the Yogurt Bacterium Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus / Oyeniran A, et al. // Current Issues and Challenges in the Dairy Industry. IntechOpen, 2020. – 124 c.
7. Widyastuti Y, Febrisiantosa A, Tidona F. Health-Promoting Properties of Lactobacilli in Fermented Dairy Products. Front Microbiol. 2021 May 21;12:673890. doi: 10.3389/fmicb.2021.673890. PMID: 34093496; PMCID: PMC8175972.
8. Car Reen Kok, Robert Hutkins, Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria, Nutrition Reviews, Volume 76, Issue Supplement_1, 1 December 2018, Pages 4–15, https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy056
9. Get to know the Lactobacilli family. Gut microbiota for health by ESNM. December 2nd, 2020 https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/new-infographic-to-meet-lactobacilli/

10. Bernardeau M, Guguen M, Vernoux JP. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiol Rev. 2006 Jul;30(4):487-513. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x. PMID: 16774584.
11. Irkitova A.N., Matsyura A.V. Ecological and biological characteristics of Lactobacillus acidophilus // Ukrainian Journal of Ecology. 2017. 7(4). P. 214–230.
12. Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? Curr Opin Biotechnol. 2018 Feb;49:140-147. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.004. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28866243; PMCID: PMC5808898.
13. Зайков С.В. Імунотропні властивості пробіотиків, вітамінів та мікроелементів / Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2014. - № 8 (77). - с. 21-28.
14. Gibson G. R., Robefroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics // J. Nutr. – 1995. – 125, №6. – P. 1401 – 1412.
15. Корниенко Е.А. Метаболическое действие микробиоты и метабиотики. РМЖ. 2016;(18):1196-1201. Режим доступа: https:// www.rmj.ru/articles/pediatriya/Metabolicheskoe_deystvie_mikrobioty_i_metabiotiki/.
16. Generally Recognized as Safe (GRAS) Determination for the Use of Bifidobacterium animalis subsp. lactis R0421 (LAFTI® B94). URL: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.fda.gov%2Fmedia%2F135324%2Fdownload&psig=AOvVaw21bpb9OfyfIKAbd4EX8_bu&ust=1653565874030000&source=images&cd=vfe&ved=0CA0QjhxqFwoTCJjy7YrN-vcCFQAAAAAdAAAAABAO (дата звернення 22.12.2021)
17. Gonchikov G.G. Kometabolizm of disaccharides and microbial consortia: bioecological and biotechnological perspectives // Inzhenernaya ekologiya. – 2002. – N 3. – P. 2–16.

18. Probiotic Supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals / West N.P et al. // Clin Nutr. 2014. Aug;33(4). P. 581-587. doi: 10.1016/j.clnu.2013.10.002.
19. Lactobacillus plantarum [Електронний ресурс] // Функциональная гастроэнтерология – Режим доступу до ресурсу: https://www.gastroscan.ru/handbook/118/5612.
20. Macfarlane G., Steed H., Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galactooligosacharides and other prebiotics // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 104 – N 2. – P. 305–344.
21. Кравченко Н.О. Вплив пребіотиків на біологічну активність молочнокислих бактерій / Н.О. Кравченко, О.М. Дмитрук, Л.В. Божок та ін.]. // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2014. –№20. – 54–59 с.
22. Пробіотики на українському фармацевтичному ринку. Режим доступу: https://thepharma.media/marketing
23. Компендіум — лікарські препарати. Джерело: https://compendium.com.ua/uk/
24. Witkin SS, Linhares IM. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? BJOG. 2017 Mar;124(4):606-611. doi: 10.1111/1471-0528.14390. Epub 2016 Nov 7. PMID: 28224747.
25. Lactiplantibacillus_plantarum_[Електронний ресурс] - Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/
26. Golod N.A., Loyko N. G., Mulyukina A.L. et al. Lactic acid bacteria adaptation to the adverse growth conditions // Microbiologiya. – 2009. – Vol. 78. – N 3. – P. 317–335.
27. Халіль А. Оптимізація процесів культивування у виробництві пробіотичних препаратів на основі лактобацил : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.20 "біотехнологія" / А. Халіль – Київ, 2004. – 26 с.
28. Gagarina, I., Gorkova, I., Kostromicheva, E., Gavrilova, A., & Polekhin, S. (2020). Microbiological synthesis optimization of probiotic microorganisms

Lactobacillus plantarum using combined nutrient media based on AIC secondary raw materials. In E3S Web of Conferences (Vol. 222, p. 02012). EDP Sciences.

29. Hayek, S., Gyawali, R., Aljaloud, S., Krastanov, A., & Ibrahim, S. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. Journal of Dairy Research, 86(4), 490-502. doi:10.1017/S002202991900075X
30. Живильні середовища. Режим доступу: https://shop.hlr.ua/himicheskie-reaktivy/reaktivy-i-rashodnye-materialy-life-science/sredy-i-dobavki/
31. 4Protection lactic acid bacteria - Plant-based products. https://www.saccosystem.com/cat-3/en/products-and-solutions-for-the-food-industry/26/4protection-special-live-cultures-for-natural-protection/125/4protection-lactic-acid-bacteria-plant-based-products/227/
32. Загальні технології харчових виробництв: навч. пос. / Домарецький В.А. та ін. Київ: Університет «Україна», 2010. 814 с
33. Фарбування_за_Грамом [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://uk.wikipedia.org/wiki/
34. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 5. — Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2021. — 424 с.
35. Stellah Byakika A Review of Criteria and Methods for Evaluating the Probiotic Potential of Microorganisms / Stellah Byakika, Ivan Muzira Mukisa, Yusuf Byenkya Byaruhanga, Charles Muyanja //Food Reviews International. - Volume 35, 2019 - Issue 5. – P. 427-466.
36. Дехтяренко Н. В., Шинкаренко Л. М., Дуган О. М. Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів // Наукові записки. Біологія та екологія. 2007. Т 67. С. 30 – 36.
37. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. Frontiers in

bioengineering and biotechnology, 9, 612285. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285

38. Джакибаева Г.Т. Способность молочнокислых бактерий синтезировать экзополисахариды / Г.Т. Джакибаева, Д.А. Тлеубекова, А. Бердалиева и др. // Микробиология және вирусология. 2021. №4 (35). URL: https://cyberleninka.ru/article/n/sposobnost-molochnokislyh-bakteriy-sintezirovat-ekzopolisaharidy (дата обращения: 24.01.2023).
39. Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., & Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. AIMS microbiology, 6(4), 451–469. https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027.

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи

Табл. 1. Склад поживного середовища для вирощування біфідобактерій

Компоненти поживного середовища	Вміст поживних речовин, г/л
Агар	0,075
Цистин	0,1
Лактоза	0,5
Молочна сироватка	0,3
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,1
NH_4Cl	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02

1. *Старовойтова С. О., Скроцька О. І., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П.* Технологія пробіотиків: Підручник. — К.: НУХТ, 2012. — 318 с.
2. *Коваленко Н. К., Полтавська О. А.* Культивування біфідобактерій і стимуляція їх росту // X з'їзд ТМУ (Одеса, 21–22 серпня 2009 р.). — С.70–75.

Двінських Н. В., Хахленкова Н. В., Онопріенко В. О.
Національний фармацевтичний університет, Харків

Значення лактобактерій — продуцентів екзополісахаридів взакваскаx

Селекцію штамів молочнокислих бактерій для заквасок проводять за рядом показників, серед яких здатність розвиватися в молоці, органолептичні та реологічні показники готового кисломолочного продукту.

В останні роки кисломолочні продукти виробляють в основному резервуарним способом і зі зниженим вмістом жиру, тому великого значення набуває селекція заквасочних мікроорганізмів, які поряд з традиційними виробничо-цінними і пробіотичними властивостями здатні покращувати консистенцію продукту.

Для реалізації цього завдання світова практика з селекції молочнокислих бактерій і підбору заквасок спрямована на пошук штамів, які продукують екзополісахариди (ЕПС) — високомолекулярні вуглеводи, які утворюють в молоці в'язкі згустки. Необхідність створення таких заквасок диктується тенденцією до споживання стовідсотково натуральних продуктів, що привело до нормативної заборони в ряді країн на використання стабілізаторів рослинного і тваринного походження в кисломолочних продуктах загального та функціонального призначення. Відіграє свою роль в доцільності розробки таких заквасочних культур також економічний чинник — вартість стабілізаторів.

Екзополісахариди синтезують багато видів молочнокислих бактерій. За даними дослідників, кількість продукованих лактобактеріями ЕПС може варіювати у термофільних молочнокислих стрептококів від 50 до 350 мг/л, у болгарської палички — від 60 до 150 мг/л. У той же час відомо, що культури, які продукують ЕПС в однакових кількостях, мо-

жуть утворювати згустки з різними реологічними властивостями. Але встановлено, що 60–70% штамів, що утворюють в'язкі згустки, продукували більшу кількість ЕПС.

Дослідженнями вчених також було доведено, що екзогенні вуглеводи виконують функцію саморегуляторів процесів росту та розвитку заквасочних консорціумів, виступають у ролі факторів, що сприяють адгезії корисних мікроорганізмів на стінках кишківника. Характеризуючись аніонною природою, ЕПС виявляють сорбуючу здатність по відношенню до токсичних елементів.

Синтез ЕПС також є одним з еволюційно вироблених механізмів адаптації мікроорганізмів до змін навколишнього середовища у відповідь на екстремальні умови культивування, що виходять за межі толерантності для цього виду. Приріст ЕПС розглядають як стресову відповідь заквасочного мікробного консорціуму на зміни pH і температури середовища. Протекторні властивості ЕПС грають захисну роль і забезпечують існування як продуцента, так і інших представників мікрофлори закваски. Наприклад, про наявність симбіотичних взаємовідносин у створюваному мікробному консорціумі свідчить активне зростання популяції мезофільних паличок, нестійких до низьких значень pH середовища (до 4 од.).

Тому своєчасною тенденцією є селекція штамів молочнокислих бактерій — продуцентів ЕПС для удосконалення складу заквасок, які забезпечуватимуть отримання кисломолочного продукту з усіма бажаними властивостями.

Декар Д. О., Решетняк Л. Р.
Національний авіаційний університет, Київ

Забезпечення умов чистого приміщення на підприємствах

Застосування чистих приміщень підвищило якість виготовлення продукції різних сфер. Кількість частинок на одиницю об'єму повітря в цих приміщеннях контролюється та не повинна перевищувати певного значення, залежного від класу чистоти.

Залежно від кількості забруднювачів 1 $м^3$ об'єму приміщення ділять на класи чистоти. Загальноприйнятою класифікацією вважається good manufacturing practice (GMP), за якою виділяють чотири класи (табл. 1).

В чистому приміщені, в залежності від його класу чистоти, організовують:

– однонаправлений потік повітря (класи чистоти А та В). Потоки повітря можуть бути вертикальними або горизонтальними. Місце подачі та виходу повітря однонаправленого потоку завжди

Ф А 2.2.1-32-366

Національний фармацевтичний університет

Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології
Ступінь вищої освіти другий магістерський
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Промислова біотехнологія

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувачка кафедри
біотехнології
Наталя ХОХЛЕНКОВА
_____
« 03 » жовтня 2022 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Владиславу ОНОПРІЄНКО

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій»,
керівник кваліфікаційної роботи: Наталія ДВІНСЬКИХ, к.фарм.н., с.н.с.
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, науковий ступінь, вчене звання)
затверджений наказом НФаУ від «14» жовтня 2022 року № 227
2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: 27.01.2023 р.
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: об'єкт дослідження –, екзометаболітний комплекс лактобактерій; мета – виявлення впливу екзометаболітного комплексу лактобактерій на ріст біомаси та активність кислотоутворення
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): вступ; огляд літератури; об'єкти і методи досліджень; експериментальна частина; висновки
6. Дата видачі завдання: «03» жовтня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Формування напряму наукового дослідження, постановка проблеми	жовтень 2022	виконано
2	Аналітичний огляд літератури	жовтень 2022	виконано
3	Вибір об’єктів та методів дослідження	жовтень 2022	виконано
4	Проведення досліджень	жовтень-листопад 2022	виконано
6	Обробка результатів та оформлення кваліфікаційної роботи	грудень 2022	виконано
8	Здача роботи до Екзаменаційної комісії	27 січня 2023	виконано

Здобувач вищої освіти _____ Владислав ОНОПРІЄНКО
(підпис) (Ім’я, ПРІЗВИЩЕ)

Керівник кваліфікаційної роботи _____ Наталія ДВІНСЬКИХ
(підпис) (Ім’я, ПРІЗВИЩЕ)

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 227
по Національному фармацевтичному університету
від 14 жовтня 2022 року

Про затвердження тем кваліфікаційних робіт

Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти 2 курсу, спеціальність – 162 Біотехнології та біоінженерія, освітня програма – Промислова біотехнологія, ступінь вищої освіти – магістр, термін навчання – 1 р. 6 міс., денна форма.

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
Онопрієнко Владислав Олексійович	Дослідження впливу активних екзометаболітів на розвиток лактобактерій	Study of the influence of native exometabolites on the development of lactobacilli	к.фарм.н., с.н.с., доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології Двінських Н.В.	к.фарм.н, доцент, доцент закладу вищої освіти кафедри промислової фармації та економіки ІПКСФ НФаУ, Шевченко В.О. к.мед.н., с.н.с., зав.лаб. загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмі в ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ, Перетятко О.Г.

Ректор **Алла КОТВІЦЬКА**

Вірно:
Декан факультету фармацевтичних технологій та менеджменту **Наталія ЖИВОРА**

Ф А2.8-03-110

ВИСНОВОК

Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти

№ 111224 від «18» січня 2023 р.

Проаналізувавши випускну кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Онопрієнка Владислава Олексійовича, 2 курсу, _____ групи, спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія , на тему: «Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій / Study of the influence of native exometabolites on the development of lactobacilli», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (компіляції).

Голова комісії,
професор **Інна ВЛАДИМИРОВА**

2%
17%

Ф А 2.2.1-32-353

ВІДГУК

наукового керівника на кваліфікаційну роботу магістерського ступеня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Владислава ОНОПРІЄНКО

на тему: **«Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій».**

Актуальність теми. В наш час великий інтерес викликають нові тенденції розвитку пробіотичних продуктів, що відновлюють мікроекологічний баланс в організмі. Сучасні уявлення про такі переваги неклітинних пробіотиків, як більший терапевтичний потенціал, висока біодоступність, відсутність конфлікту з власною мікробіотою макроорганізму, відсутність латентного періоду для реалізації біологічного ефекту, безпека, вищі споживчі властивості лікарських форм та довші терміни придатності, роблять дослідження екзометаболітних комплексів бактерій, зокрема лактобактерій, які є основними компонентами більшості пробіотичних засобів, дуже актуальними.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Виявлений експериментально бактеріотропний ефект екзометаболітного комплексу лактобактерій може бути використано для стимуляції росту та кислотоутворення пробіотичних мікроорганізмів. Результати в перспективі можна застосовувати при проведенні робіт з удосконалення технологій отримання біомаси лакто- та інших пробіотичних бактерій та для створення нових препаратів-метабіотиків і інших продуктів з пробіотичними властивостями.

Оцінка роботи. У роботі розглянуто теоретичні питання та обґрунтовано актуальність досліджень, виконані заплановані дослідження з вивчення бактеріотропної дії екзометаболітного комплексу, проведені необхідні розрахунки та порівняльний аналіз даних. Зроблено висновки та запропоновано напрямки використання отриманих результатів.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Дана кваліфікаційна робота містить всі необхідні розділи, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт магістра та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії, а її автор заслуговує присвоєння кваліфікації «магістр з біотехнологій та біоінженерії».

Науковий керівник _____ Наталія ДВІНСЬКИХ

(підпис) (Ім’я, ПРІЗВИЩЕ)

« 24 » січня 2023 р .

Ф А 2.2.1-32-356

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу Владислава ОНОПРІЄНКО
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

на тему: **«Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій».**

Актуальність теми. Сучасною тенденцією є створення нового класу пробіотичних препаратів - метабіотиків, які не містять живих бактерій, а отже, не мають недоліків пробіотиків, але дозволяють створити керований мікробіоценоз кишечника, оскільки метаболічні, сигнальні, транспортні та інші функції представників індигенної мікробіоти мають більше значення, ніж кількісний вміст у біотопі мікроорганізмів. Тому дослідження властивостей екзометаболітів пробіотичних бактерій з метою удосконалення технологій традиційних та створення технологій нових пробіотичних препаратів є доцільним та актуальним, дозволить підтримувати функціонування організму на необхідному рівні.

Теоретичний рівень роботи. На основі аналізу наукової літератури теоретично обґрунтовано перспективність дослідження нативних метаболітних комплексів пробіотичних бактерій для використання як бактеріотропних чинників при створенні клітинних та неклітинних пробіотичних засобів.

Пропозиції автора з теми дослідження. Автором запропоновано використання екзометаболітного комплексу лактобактерій для додавання до складу живильних середовищ як бактеріотропного засобу та в якості діючого компоненту при розробці складу метабіотиків як лікувально-профілактичних засобів та інших продуктів з пробіотичними властивостями.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Отримані результати виявили стимулюючий вплив екзометаболітів на збільшення біомаси та кислотності при культивуванні лактобактерій, що є перспективним заходом для підвищення продуктивності виробничих процесів отримання біомаси лактобактерій при створенні традиційних клітинних препаратів та можуть бути покладені в основу розробки нових видів неклітинних пробіотиків. Рівень проведення досліджень та застосовані методи є достатніми для того, щоб результати можна було вважати обґрунтованими.

Недоліки роботи. В роботі є деякі невдалі вирази, деякі розділи можна було викласти менш докладно.

Загальний висновок і оцінка роботи. Робота містить всі необхідні розділи, розрахунки та дослідження, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт ступіня вищої освіти «магістр» та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії НФаУ.

Рецензент,
Зав. лаб. загальної мікробіології
з Музеєм мікроорганізмів ДУ
«Інститут мікробіології та імунології
ім. І.І. Мечникова НАМНУ»,
к. м. н., с.н.с. Олена ПЕРЕТЯТКО

«25» січня 2022 р.

Ф А 2.2.1-32-356

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу _____Владислава ОНОПРІЄНКО_____
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

на тему: **«Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій».**

Актуальність теми. Сьогодні відбувається концептуальний перегляд уявлень про пробіотики. Їм на зміну приходить нове покоління біотиків – метабіотики, найважливішою складовою яких є клітинні компоненти, метаболіти та сигнальні молекули пробіотичних культур. Тому дослідження властивостей екзометаболітів пробіотичних бактерій з метою удосконалення технологій традиційних та створення технологій нових пробіотичних препаратів є доцільним та актуальним.

Теоретичний рівень роботи. У роботі на достатньому рівні проведено аналіз даних літератури з питання асортименту пробіотичних ліків, напрямків їх удосконалення, переваг неклітинних форм пробіотиків, умов розвитку лактобактерій та особливостей середовищ для їх культивування. Обґрунтовано доцільність використання метаболітів лактобактерій та проведено ретельний аналіз результатів експериментальних досліджень, зроблені ґрунтовні висновки.

Пропозиції автора з теми дослідження. На основі отриманих результатів в роботі запропоновано використання метаболітів лактобактерій як стимуляторів накопичення біомаси, для створення препаратів-метабіотиків з варіабельністю біологічних властивостей для профілактики та корекції різних патологічних станів організму, а також для удосконалення складу заквасок з різним призначенням для молочнокислих продуктів.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Виявлена бактеріотропна дія екзометаболітів лактобактерій дозволяє скоротити тривалість культивування, активізувати кислотоутворення, що можна використовувати для підвищення ефективності технологічних процесів отримання препаратів пробіотичних мікроорганізмів, та є підґрунтям для створення метаболітних препаратів, застосування яких дозволить отримати терапевтичний ефект якнайменше на рівні традиційних засобів з живими пробіотиками, а вірогідно і більший. Рівень проведення досліджень та застосовані методи є достатніми для того, щоб результати можна було вважати обґрунтованими.

Недоліки роботи. В роботі є деякі невдалі вирази, деякі розділи можна було викласти менш докладно.

Загальний висновок і оцінка роботи. Робота містить всі необхідні розділи, розрахунки та дослідження, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт ступіня вищої освіти «магістр» та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії НФаУ.

Рецензент,
Доц. закладу вищої освіти
кафедри промислової фармації та
економіки ІПКСФ НФаУ,
к.фарм.н, доцент _____ В'ячеслав ШЕВЧЕНКО

«25» січня 2022 р.

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 7

«26» січня 2023 року м. Харків

Засідання кафедри біотехнології

Голова: завідувачка кафедри, доктор фармацевтичних наук, професор Наталя ХОХЛЕНКОВА.

Секретар: асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

ПРИСУТНІ: завідувачка кафедри Наталя ХОХЛЕНКОВА, професор закладу вищої освіти Леонід СТРЕЛЬНИКОВ, професор закладу вищої освіти Оксана СТРІЛЕЦЬ, доцент закладу вищої освіти Ольга КАЛЮЖНАЯ, доцент закладу вищої освіти Микола РИБАЛКІН, доцент закладу вищої освіти Юлія АЗАРЕНКО, доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ, асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Про представлення до захисту до Екзаменаційної комісії випускних кваліфікаційних робіт.

І. СЛУХАЛИ:

Здобувача вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія» ОП «Промислова біотехнологія» денної форми 2 курсу 1 групи Владислава ОНОПРІЄНКО з доповіддю на тему «Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій» (керівник доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ).

УХВАЛИЛИ:

Рекомендувати до захисту кваліфікаційну роботу.

Голова
Завідувачка кафедри,
доктор фармацевтичних наук,
професор _____ Наталя ХОХЛЕНКОВА
(підпис)

Секретар
асистент закладу вищої освіти _____ Аліна СОЛОВЙОВА
(підпис)

Ф А2.2.1-32-042

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Направляється здобувач вищої освіти Владислав ОНОПРІЄНКО
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)
до захисту кваліфікаційної роботи
за галуззю знань 16 Хімічна та біоінженерія
спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньою програмою Промислова біотехнологія
на тему: «Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ Наталія ЖИВОРА

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Владислав ОНОПРІЄНКО рекомендується до захисту в Екзаменаційній комісії з кваліфікаційною роботою на тему: «Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій».

Керівник кваліфікаційної роботи _____ Наталія ДВІНСЬКИХ

«24» січня 2023 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Владислав ОНОПРІЄНКО допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри біотехнології _____ Наталя ХОХЛЕНКОВА

«26» січня 2023 року

Кваліфікаційну роботу захищено
у Екзаменаційній комісії
«01» лютого 2023 р.
З оцінкою _____
Голова Екзаменаційної комісії,
кандидат сільськогосподарських наук
_____ / Олена ЩЕРБАК /