МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

спеціальність 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

Допустити до захисту	Рекомендувати до захисту
Декан_____М.І.ГИЛЬ	Зав.кафедри_____С.І.ЛУГОВИЙ
«____»_____20__ р.	«____»_____20__ р.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЙ ОТРИМАННЯ ПОЛІШТАМОВИХ ПРОБІОТИКІВ

04.02. – ДР.003 - 21.02.03.001

Виконавець:

здобувач вищої освіти IV курсу

_____Бондарчук В.О.

Науковий керівник:

професор _____Гиль М.І.

Рецензент:

директор Миколаївської РДЛВМ

_____Малай В.І.

Миколаїв 2021

ЗМІСТ

Реферат	3
Вступ	5
1. Літературно-патентний огляд	9
1.1. Історичні аспекти розвитку пробіотиків	9
1.2. Сучасні винаходи відомих біотехнологів	19
2. Експериментальна частина	27
2.1. Об’єкти і методи дослідження	27
2.1.1 Об’єкти дослідження	27
2.1.2 Методи дослідження	28
2.2. Результати та їх обговорення	30
2.2.1 Методи відбору пробіотичних організмів	30
2.2.2 Технології ферментації при виробництві пробіотиків	41
2.2.3 Технології консервування пробіотиків	43
2.2.4 Розробка поліштамових пробіотичних препаратів	48
3. Технологічна частина	50
4. Безпека життєдіяльності	59
Висновки	65
Список використаної літератури	67

РЕФЕРАТ

Випускна кваліфікаційна робота складається з 76 друкованих сторінок і містить 2 рисунки, 4 таблиці і 86 використаних літературних джерел.

Перелік ключових слів: пробіотики, мікробіом, поліштамові і моноштамові препарати, біфідобактерії, анаеробна інкубація, ліофілізація, сублімація, консорціум культур, кисломолочна продукція.

Об'єктом даного дослідження є бактеріальні культури, зокрема *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *L. Casei*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus*, *St. thermophilus*, *L. helveticus* та інші.

Предметом дослідження є запроваджувані у підприємстві біотехнології використання перспективних пробіотичних штамів з метою підвищення ефективності технологій їхнього культивування..

Мета кваліфікаційної роботи – враховуючи аналіз досліджень технологій на важливих етапах виробництва поліштамових пробіотиків – встановити найпростішу і найбільш ефективну технологію їх виготовлення, а також стратегію їх використання для зміцнення імунітету людини.

В умовах виробництва було проведено досліди із підбору селективних середовищ для різних груп мікроорганізмів, порівняно технології масштабування, ферментації, концентрування та сушіння пробіотичних препаратів та продуктів.

У результаті дослідження було визначено вплив того чи іншого середовища на розвиток певного виду, штаму, або групи штамів бактерій завдяки якісній оцінці біооб'єктів на основі моделей ферментації цукру, використанні інгібуючих речовин, різних температур, умов і тривалості інкубації. Визначено переваги та недоліки ліофільної сушки та кріоконсервування, як способів тривалого зберігання готових продуктів.

Галузь застосування результатів дослідження: харчові і фармацевтичні виробництва, зокрема молокопереробні підприємства, що спеціалізуються на виготовленні продукції із застосуванням поліштамових пробіотиків та молочнокислих заквасок з їх додаванням.

Виходячи з аналізу дослідження і його результатів, об’єкт вивчення має широкі перспективи розвитку і значні передумови для подальшого поглибленого вивчення науковцями і дослідниками.

ВСТУП

Актуальність дослідження. Людське тіло є унікальним резервуаром для різноманітних груп мікробів, які разом утворюють «суперорганізм мікробіома» *Homo sapiens*. Кишківник людини слугує середовищем існування для більш ніж 1000 видів бактерій, що в першу чергу модулюють внутрішнє середовище свого господаря і, таким чином, відіграють важливу роль у здоровому функціонуванні людського організму.

Ці вражаючі симбіотичні відносини привернули значну увагу вчених і сприяли появі великої кількості досліджень у цій галузі. Зокрема, вище згадані мікроорганізми відіграють ключову роль у забезпеченні захисної функції, катаболізмі і анаболізмі, впливають на реакції кишківника і мозку. Поява мікробіотної резистентності і толерантності до існуючих звичайних ліків і антибіотиків знизила ефективність цих лікарських засобів [1].

Сприятливі ефекти діяльності певних мікроорганізмів відображені в концепції пробіотиків, що визначаються як «живі мікроорганізми, які при введенні в адекватних кількостях приносять користь здоров'ю господаря». Крім того, певні мікробні субстрати, звані пребіотиками, можуть вибірково використовуватися мікроорганізмами, тим самим приносячи необхідну користь здоров’ю людини.

Пробіотики показали себе перспективними об’єктами для вивчення і застосування для різних цілей в галузі охорони здоров'я, включаючи профілактику діареї, пов'язаної з антибіотиками (включаючи діарею, спричинену *Clostridium difficile*), профілактику некротичного ентероколіту та сепсису у недоношених дітей, лікування дитячих кольок, лікування пародонтозу та індукцію підтримки ремісії у разі виразкового коліту.

Можливості в галузі застосування пробіотиків і пребіотиків значною мірою пов'язані з тим, як вони впливають на мікробіоту і взаємодіють з господарем. Вважається за необхідне проаналізувати сучасні відкриття,

передові технології і суперечливі результати з точки зору дослідників, які впроваджують інновації в цих напрямах. Вперше це питання було підняте на обговорення на засіданні Міжнародної наукової асоціації пробіотиків і пребіотиків – Асоціації студентів і стипендіатів (ISAPP-SFA) у 2019 році [2].

Враховуючи вищезгадане, ми впевнені, що досліджувана тема заслуговує на особливу увагу серед науковців. А тому необхідно зазначити, що на даному етапі дослідження неможливо однозначно стверджувати, чи є мультиштамові пробіотичні добавки більш ефективними, ніж окремі штами.

На противагу вищезгаданим міркуванням, було проведено набагато більше досліджень ефективності окремих штамів кишкових бактерій. Однією з переваг використання саме одноштаммових препаратів є те, що вони дозволяють споживачу обирати, кількість яких саме здорових бактерій йому слід збільшити. У кожної людини своя екосистема бактерій, і іноді спостерігається дефіцит або повна відсутність певних корисних мікроорганізмів. Проблема фрагментарно висвітлювалася в одному з досліджень. Результати цього експерименту відобразили, що певні штами можуть бути «щеплені» до кишкових мікробів, в якому він відсутній. Ці дані свідчать про те, що види бактерій, що не живуть в мікробіомах кишківника деяких людей, можуть бути відновлені і це дозволяє точно і індивідуально відновити мікробіом [2].

Останнім часом поширюється практика проведення інноваційних діагностичних тестів, які засновані на аналізі ДНК і використовуються для визначення складу мікробіома людини. Ці нові інструменти дають змогу споживачу значно спростити процес прийняття аргументованого рішення про вибір пробіотичних добавок і допомагають в розробці більш ефективних продуктів, заснованих на індивідуальних потребах.

Однак в більшості випадків науковці все ще не дійшли загальноприйнятого компромісу про те, які пробіотики є абсолютно корисними, а які – ні. Разом з тим, дослідникам слід працювати над пошуком

відповіді на те, яку кількість пробіотичних препаратів доведеться приймати людям і хто, швидше за все, отримає від них максимальну користь. Саме завдяки актуальності цих питань, вважається за необхідне приділити більше уваги аналізу проблеми культивації, поширення пробіотиків, їхнього впливу на організми різних людей і, звісно, пріоритетності переважного вживання поліштамових або одноштамових препаратів.

Мета кваліфікаційної роботи – враховуючи аналіз досліджень поліштаммових пробіотиків встановити найпростішу і найбільш ефективну технологію їх виготовлення, а також стратегію їх використання для зміцнення імунітету *Homo sapiens*.

Досягти головної мети ми можемо шляхом вирішення поточних з*авдань випускної кваліфікаційної роботи*. Серед них:

- дослідити історичні аспекти розвитку пробіотиків і проаналізувати наукові роботи вчених різних поколінь;
- провести ретельне вивчення сучасних відкриттів, передових технологій і суперечливих результатів з точки зору вчених, які впроваджують інновації в цих галузях знань;
- провести власні експерименти з різними видами пробіотиків на молокопереробному підприємстві;
- надати порівняльний аналіз біотехнологій використання поліштамових пробіотиків, виходячи з результатів власного дослідження;
- охарактеризувати головні аспекти охорони праці і безпеки життєдіяльності у лабораторіях, що спеціалізуються на пробіотиках;
- узагальнити результати проведеної роботи у висновках.

Об'єктом дослідження є бактеріальні культури, зокрема такі як *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*,

L. delbrueckii ssp. Bulgaricus, *L. Casei*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus*, *St. thermophilus*, *L. helveticus* та інші.

Предметом дослідження є запроваджувані у підприємстві біотехнології використання перспективних пробіотичних штамів з метою підвищення ефективності технологій їхнього культивування.

Теоретичною основою кваліфікаційної (дипломної) роботи послужили дослідження багатьох вітчизняних і зарубіжних вчених різних поколінь. Серед них окремо хочемо виділити роботи Томаса Вілліса, Луї Лемері, І.І.Мечникова, А. Нісль, Б.А.Шендерова, Р.Фуллера, Томотарі Міцуока, Дж.Р. Гібсона, М.Б. Робертройда та інших.

Практична частина роботи виконувалася на підставі статей і досліджень з німецьких, американських, французьких та інших світових наукових видань і довідників, таких як International Dairy Journal, Journal of Dairy Science, Food Science and Technology, Journal of Applied Microbiology, Front. Microbiol, Regulation of the European Parliament and of the Council of Europe 5 April 2017 on Medical Devices, Amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and Repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC, Clinical and Experimental Allergy та інші, а також власних спостережень в умовах ПрАТ «Лакталіс-Миколаїв» (м. Миколаїв).

1. ЛІТЕРАТУРНО-ПАТЕНТНИЙ ОГЛЯД

1.1. Історичні аспекти розвитку пробіотиків

Останнім часом швидкість поширення інформації про пробіотики зростає високими темпами. Це призводить до непорозумінь і дискусій серед широкої аудиторії. На сьогоднішній день будь-хто бажаючий може знайти неймовірну кількість літератури та точок зору різних вчених, пов'язаних з цією тематикою досліджень. Але, звісно, так було не завжди.

Як свідчить історичний досвід, *Lactobacillus bulgaricus* була відома фракійцям, які населяли сучасні болгарські землі більше 7-8 тисяч років тому. Одне з визначних досягнень фракійської цивілізації – молочнокисле бродіння. Наприклад, слово «йогурт» має фракійське походження. «Йогху» означає твердий, а «рт» – молоко. Секрет молочнокислого бродіння є предметом не тільки давньої міфології і філософії, але і сучасних наукових досліджень [3].

Найдавніші достовірні письмові записи про застосування молочнокислого бродіння належать батькові історії Геродоту (484 - 425 до н.е.). Під час своєї подорожі по фракійских землях він писав, що фракійці готували особливі кисломолочні продукти, що були подарунком від богів [4].

У прадавніх, що в основному пояснювалося Гіппократом і Галеном з Пергама, травлення або, точніше, приготування їжі в шлунку, відбувалося під впливом тепла. Шлунок схожий на горщик, нагрітий печінкою, в якому їжа готується, розщеплюється, а потім поживні частини передаються в печінку і перетворюються в кров, а потім в інші три рідини (мокрота, жовч і меланхолія або чорна жовч). Галенівська модель «приготування їжі в шлунку» вважалася істинною майже 1500 років після його смерті, як і вся система гуморальної фізіології [5-7].

Так було до тих пір, поки алхімік Парацельс (також відомий як батько сучасної хімічної фармації) не запропонував альтернативну систему

фізіології, засновану не на чотирьох рідинах, а на трьох хімічних речовинах: ртуті, сірки і солі [8].

Він наполягав на тому, що тілесні процеси залежать від процесів трансформації, що відбувається в результаті хімічних реакцій. Парацельс розумів їх не як прості комбінації та перетворення молекул в інші, а як містичні і духовні процеси, керовані надприродними силами [9].

Послідовники Парацельса позбавили його ідеї деяких фантастичних рис, але зберегли ключову концепцію. Ван Гельмонт, найважливіший послідовник Парацельса, також досліджував хімічні реакції в організмі. Він був впевнений, що існує сила, яка змушує наш шлунок розщеплювати матерію на поживні речовини, які наш організм може використовувати [10].

Ван Гельмонт далі припустив, що цей процес, який він назвав «ферментацією», дуже схожий на той, що відбувається з вином, коли воно перетворюється з сусла в спирт і коли ферментовані продукти стають кислими. Той же процес відбувається в шлунку, оскільки він виробляє кислоту, яка розщеплює їжу. Тобто це була абсолютно нова модель травлення, заснована на кислих ферментах [11]. Під поняттям «травлення» він мав на увазі подальше і послідовне очищення продуктів харчування в різних частинах тіла, починаючи з шлунка і закінчуючи кожною частиною тіла, кров'ю в серці і духами в мозку [12].

Ця теорія також певним чином заснована на спостереженнях за дією бактерій поза організмом: зниження pH, яке відбувається при лактобациллярному бродінні, відновленні, яке відбувається, коли дріжджі розщеплюють цукор на спирт, а також розкладанні, коли жива матерія гниє, генерує власне тепло і, в деяких випадках, за думкою тогочасних вчених, мимовільно породжує форми життя, знову ж мух і равликів [12].

Ван Гельмонт дуже цікавився повітряними речовинами, які є побічними продуктами бродіння, і він фактично ввів термін «газ» в сучасному розумінні цього слова. Цей вчений досліджував вуглекислий газ,

що виділяється при перетравленні мікробами рослин, який він називав газовим Сильвестром, незалежно від того, чи виділяється газ внаслідок спалювання деревини чи ферментації винограду та овочів [11].

Ці ідеї були об'єднані під всеосяжну теорію кислотного травлення Франциска Сільвія де ле Бо і, фактично, в цілу фізіологічну систему, засновану на кислотах і лугах в організмі [13].

Ферментація також грала центральну роль в його уявленнях про метаболізм, і Сільвія де ле Бо припустив, що ферментам потрібні не тільки вода і тепло, а й повітря, яке, звичайно ж, несе бактерії і дріжджі. Саме Сільвію історики приписують походження хімічного розуміння травних ферментів [14].

Травлення для Сільвія, проте, було різновидом бродіння. У його Praxeos Medicae 1671 г. (том 3, 27) він свідчить, що неправильне травлення є результатом занадто сильного або дуже слабкого бродіння [15]. Ферментація також грала центральну роль в його уявленнях про метаболізм, і вчений припустив, що ферментам необхідні не тільки вода і тепло, а й повітря.

Інший вчений кінця 17 століття висунув набагато більше інтригуючих і перспективних теорій на тему ферментації. Це був Томас Уілліс, якого сьогодні пам'ятають в основному завдяки дослідженню артерій, що постачають кров у мозок, тепер відомих як коло Уілліса (Вілліса) [16].

У своєму «Філософському дискурсі про ферментації або русі частинок у кишківнику кожного тіла» Вілліс додав до хімічної філософії теорію частинок або корпускул, які стикаються і взаємодіють, що мало чим відрізняється від взаємодіючих і змінюють структуру молекул. У передмові до роботи Вілліс визнає, що він мав намір просто обговорити дію ферментів і набухання в пекарській печі і пивоварній печі, але замість цього виявив, що ферментація є центральним елементом всього в природі і ключем до генерації [17].

Томас впевнений, що бродіння – це процес, який пояснює зміни у всій природі, як творення, так і розпад. Він думав про те, як насіння перетворюються в рослини, як кров утворюється і циркулює в людському тілі, як дорогоцінні метали утворюються всередині землі, як жива речовина розпадається і руйнується [17].

Вілліс також підтримував концепції, почерпнуті з хімії, і мав елементарну теорію, яка включала духи, сірку, сіль, воду, землю і т.ін. Дискутуючи про сірку, він говорив, що речовини, що містять її у великій кількості, при розпушенні викликають перемішування цих частинок і стають дуже гарячими, як в купці гною або сіна (тут можна побачити аналогію з дією бактерій у вигляді компостування) і вони випускають запах гнилі, тобто розлітаються летючі частинки [18]. З іншого боку, ті, які складаються в основному з солей, як людська кров, молоко, стиглі фрукти, цукри, рослинні речовини, спочатку відрізняються солодким смаком, але в процесі бродіння стають кислими. Таким чином спостерігаємо, що бродіння лактобацил відрізняється від інших.

Основна критика вчених XXI століття теорії Вілліса полягає в тому, що він поєднує зростання і зачаття з ферментацією або вважає ці процеси її різновидом. Але, на відміну від своїх сучасників, він має рацію, вважаючи бродіння живим процесом, а не просто хімічною реакцією.

Досліджуючи роботи вчених 17 століття, можна впевнитися, що все більше людей були зацікавлені питанням травлення, і тому виникає питання: чи дійсно фізіологи і фахівці з кулінарії рекомендували ферментовані продукти для поліпшення травлення або в якості пробіотиків, що сприяють здоров'ю та довголіттю? Позитивна відповідь на це запитання повністю переверне базову теорію фізіології Галена, яка засуджувала більшість солоних і ферментованих продуктів як занадто твердих і важких для переварювання, до яких він включав мариноване м'ясо, рибу і старий сир, а також ферментовані овочі.

Робота «Traité des aliments» Луї Лемері, написана в 1702 році, дає відповідь на це запитання [19]. Його батько, Ніколас, був відомим хіміком, точним сучасником Вілліса і також використовував корпускулярну теорію. Лемері також використовує поняття ферментації в своєму коментуванні травлення. Обговорюючи роль слини, він говорив: «Деякі кислотні солі, що містяться в цьому розчині, також сприяють ферментації харчових продуктів, так само як невелика кількість леваіна, змішаного з тестом, сприяє його ферментації» [19].

Коментарі Лемері про конкретні продукти харчування є цікавою сумішшю галенових, хімічних і механічних теорій. Його зауваження про сир особливо цікаві. Сир – це твердий сир, відокремлений від сироватки під дією кислої закваски. Він дуже поживний в помірних кількостях і «в невеликій кількості може сприяти травленню, оскільки додає свою (власну) ферментацію до інших харчових продуктів, так само як кислий Левен зброжує хліб» [20]. Або, як ми б сказали, бактерії в ферментованому сирі підсилюють бактерії біома кишківника.

На початку 18 століття відбувалися запеклі академічні баталії між ортодоксальними прихильниками хімічного травлення і тими, хто вірив в механічне травлення. Одні з цих дебат відбулися між Філіпом Еке і Ніколя Андрі і проходили в медичній школі Паризького університету [21].

Філіп Еке фактично є першим, хто представив наукові аргументи на користь вегетаріанства, заявивши, що продукти, які легко розщеплюються (такі як овочі), є найбільш поживними. Еке заявив, що, оскільки травлення було повністю механічним, то і їжа, яка легко перетравлюється, насправді є найбільш поживною, тому не потрібно боятися їсти овочі або рибу під час поста. Ці дебати вилилися в дієтичні і фізіологічні трактати [22].

Отже, були і науковці, які не тільки заперечували, що ферментація сприяє розщепленню їжі, але також були впевнені, що вона є причиною неправильного травлення, здуття живота, газів і, в кінцевому підсумку, інших

хвороб. Прикладом цього є робота Гідеона Харві «Марнославство філософії та фізики» [23].

Приблизно на рубежі 18 століття з'явилося безліч інформації від мандрівників, які згадували різні ферментовані продукти, що вживаються в їжу у всьому світі, і їх цілющі властивості. В універсальному словнику Ефраїма Чемберса [24] йдеться, що в Туреччині є популярний напій, який вони називають «ігур», який п'ють, розведений водою, який, як встановлено, охолоджує і живить набагато краще, ніж одне молоко. У 1691 році під час подорожі англійських купців в Алеппо згадується «leben, густе кисле молоко, що користується великою повагою у цих спекотних країнах, дуже корисне для угамування спраги: і справді воно нам було потрібно тут ...» [24].

Західні лікарі знали, що в стародавні часи люди вихваляли кисле молоко, але на сході вони зіткнулися з живими традиціями і часто були зацікавлені в їх розповсюдженні для підтримання здоров'я жителів Європи.

Через 2000 років після перших спроб вивчати ферментацію і бродіння розпочинається новий вирішальний етап в науці. Австрійський вчений Теодор Ешеріх (1857-1911) у своїй науковій роботі зобразив важливу фізіологічну роль кишкових паличок *Escherichia coli* в діяльності шлунково-кишкового тракту. Хоча ця праця фактично є фундаментальною в досліджуваній галузі, пріоритетні погляди у формуванні класичних знань про пробіотики, роль кишкової мікробіоти (КМ) та характер її взаємодії з макроорганізмом (холобіонтом) належить саме вітчизняним вченим [25].

У 1905 році у віці 27 років болгарський лікар Стамен Григоров став відомим на весь Світ своїм відкриттям. С.Григоров отримав середню освіту у сфері природничих наук в Монпел’є у Франції і у сфері медичної освіти у Женеві, Швейцарія. У мікробіологічній лабораторії професора Леона Массоля у Женеві Стамен Григоров виявив, що в основі йогурту лежить деякий штам бацил. На знак визнання, наукове товариство назвало цей штам *Lactobacillus bulgaricus* [26].

У 1950-х роках державна компанія з виробництва йогуртів запатентувала і розповсюджувала унікальну суміш бактеріальних штамів для створення «офіційного болгарського йогурту». Навіть в сучасні дні ця суміш продовжує експортуватися виробниками йогуртів у багато країн.

Роботи і дослідження С. Григорова не залишалися без уваги. На початку 20 століття основи сучасного дослідження пробіотиків заклав російський вчений Ілля Мечников – лауреат Нобелівської премії, директор Інституту Пастера в Парижі. У своїй теорії «Про довголіття і омолодження людини» він стверджував, що довге і здорове життя болгарських селян – це безсумнівний результат щоденного вживання кисломолочних продуктів. Додатковим аргументом цього ствердження був факт, що в Болгарії на той час було найбільше довгожителів на душу населення (4%), найменше випадків виявлення ракових пухлин і низька захворюваність серед населення [27].

Дослідник з'ясував, що в товстому кишківнику людей відбуваються гнилісні процеси, що супроводжуються утворенням токсинів, які засвоюються організмом [28]. Це викликає аутоінтоксикації, що пошкоджують внутрішні органи. І.І.Мечников виявив, що цей шкідливий ефект можна усунути шляхом регулярного заселення лактобацил, і рекомендував щоденне вживання молочнокислих продуктів. Ідея вченого була в цілеспрямованій зміні складу мікрофлори шлунково-кишкового тракту шляхом ентерального введення культур молочнокислих бактерій як антагоністів гнилісних бактерій. Ця теорія переросла в науковий напрямок і призвела до створення нового класу бактеріальних препаратів – пробіотиків [27].

У 1917 році, ще до відкриття пеніциліну Олександром Флемінгом, німецький професор Альфред Нісль виділив непатогенних штам кишкової палички (*Escherichia coli*) з калу солдата Першої світової війни, в якого на тлі спалаху тяжкої епідемії бактеріальної дизентерії (шигельоз) дивним чином не

розвинувся ентероколіт. Кишкові розлади часто лікувалися життєздатними непатогенними бактеріями, що повинні були змінити або замістити патогенну мікрофлору кишківника. Штам *Escherichia coli Nissle* 1917 – один з небагатьох прикладів пробіотика, що не належить до групи КМБ. Анрі Тіссьер (Інститут Пастера) вперше виділив бактерію *Bifidobacterium* з калу грудного немовляти і назвав виявлений мікроб *Bacillus bifidus communis*. Тіссьер заявив, що біфідобактерії зможуть замінити протеолітичні бактерії, що викликають діарею, і рекомендував вводити біфідобактерії немовлятам у разі розвитку цього симптому [29].

В роботі Б.А. Шендерова з співавторами [30] простежено історію появи терміна «пробіотики» і його тлумачення різними дослідниками. На його думку, термін «пробіотик» ввели Д.М. Ліллі і Р.Г. Стіллвел у 1965 р. для позначення мікробних метаболітів, що володіють здатністю стимулювати зростання мікроорганізмів. У 1970 р. М. Грос і Дж. Желін назвали пробіотиками біологічні препарати, що представляють собою стабілізовані культури сімбіонтних мікроорганізмів або продукти їх ферментації, що сприяють зростанню останніх.

Крім того, серед робіт 1970-х років можна знайти досить цікаву наукову працю професора Томотарі Міцуока, який проклав шлях до створення і застосування теорії балансу кишкової флори для збереження здоров'я людини і запобігання хворобам. Його прихильність була вирішальною для вкладу та розвитку перших методів культивування та дослідження бактерій кишкової мікрофлори, та у подальшому – для відкриття, класифікації та найменування численних молочнокислих і анаеробних кишкових бактерій [31].

Книга «Кишкова флора і здоров'я», опублікована в 1978 році, і в наш час залишається одним з актуальних джерел при вивченні особливостей молочнокислих бактерій. У своїй науковій роботі доктор Томотарі Міцуока докладно розповів, як склад кишкової мікрофлори змінюється протягом

життя людини, і як кількість біфідобактерій зменшується з її віком [32]. При цьому, він досліджував, як одночасно зростає і тенденція захворювань товстої кишки. Проаналізувавши сучасні світові дослідження і експерименти, науковець підтримав теорію про те, що пероральний прийом пробіотиків, включаючи біфідобактерії, поліпшить баланс кишкової флори і має здатність запобігати розвитку захворювань нижніх відділів кишківника [32].

У 1974 р Р.Б. Паркер назвав пробіотиками мікробні препарати (мікроорганізми або їх компоненти), що регулюють мікрофлору кишківника [33].

У Данії Т. Ріїзе [34] запропонував під назвою пробіотик розуміти «... збільшення кількості корисних мікроорганізмів в травному тракті тварини-господаря шляхом введення великих кількостей бажаних бактерій для переустановлення і підтримки ідеальної ситуації в кишківнику».

Р. Фуллер [35] вважає пробіотиками «живу мікробну кормову добавку, яка надає корисну дію на тварину-господаря шляхом поліпшення його кишкового мікробного балансу».

На думку Г.А. Сафонова [36], термін «пробіотики» був запропонований Паркером для позначення мікроорганізмів і продуктів їх ферментації, що володіють антагоністичною активністю по відношенню до патогенної мікрофлори.

У 1992 р. Хавенаар розширив визначення пробіотиків щодо господаря та середовища існування мікрофлори наступним чином: «Життєздатна моно- або змішана культура мікроорганізмів, що застосовується до тварин або людини, благотворно впливає на господаря, покращуючи властивості корінної мікрофлори» [37].

Сальмінен та Шаафсма ще більше розширили визначення пробіотиків, не обмежуючи наслідки для здоров'я впливом на корінну мікрофлору. За словами Сальмінена, пробіотик – це "жива мікробна культура або культивований молочний продукт, який благотворно впливає на здоров'я та

харчування організму". За словами Шаафсма, "пероральні пробіотики – це живі мікроорганізми, які при пероральному прийомі в певній кількості справляють вплив на здоров'я, виходячи з основного харчування" [38, 39].

На відміну від попередніх визначень, визначення Сальмінена розглядає культурні молочні продукти та культури мікробів як пробіотик. Дійсно, матриця продукту може впливати на активність мікробів, а отже, на виживання та дію мікробів, і тому заслуговує на розгляд. Однак, оскільки немолочні продукти (наприклад, квашена капуста, ферментовані крупи та інші продукти на рослинній основі та салямі) можуть містити життєздатні пробіотичні мікроорганізми (наприклад, *Lactobacillus plantarum*), обмеження визначення поняттям молочні продукти не є виправданим [38].

Крім того, асортимент молочної продукції включає в себе продукти, які культивують, а потім пастеризують або стерилізують, що призводить до втрати життєздатних мікроорганізмів. Існують достовірні дані про антиканцерогенну та імуномоделюючу властивість, яку мали йогуртові фракції та компоненти клітинної стінки лактобактерій та біфідобактерій [38].

Продукти, які підходять під визначення, дані Сальміненом та Шаафсмою, включають йогурт, що містить звичайні культури (*Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus delbrüecki*, *subsp. Bulgaricus*), оскільки ці культури можуть компенсувати недостатність лактази при порушеннях завоєння лактози [38, 39]. Ця заміна може бути ще більш вираженою, коли бактерії, що не виживають у тонкій кишці, потрапляють всередину і виділяють свою галактозидазу у верхню частину кишківника. Цей ефект також може бути досягнутий завдяки бактеріям, які були знищені опроміненням, що залишає їх клітинні стінки цілими і, отже, забезпечує захист під час шлункового транзиту.

Вище згадані дослідження були розглянуті на симпозіумі «Пробіотики та пребіотики», що відбувся в м. Кіль, Німеччина, 11–12 червня 1998 р. Крім того, роботи вчених з цього симпозіуму (а саме Юрген Шрезенмайр та Майкл

де Врезе) були опубліковані у 2001 році Американським товариством клінічного харчування за підтримки інституту фізіології та біохімії харчування Федерального центру молочних досліджень, м. Кіль, Німеччина [40].

1.2. Сучасні винаходи відомих біотехнологів

За визначенням Дж.Р. Гібсона, М.Б. Робертройда [41], пробіотики – це мікробіологічні харчові добавки, які благотворно впливають на господаря шляхом поліпшення мікробіологічного балансу його кишківника.

Розглядаючи проблему дисбактеріозу, А.А. Воробйов зі співавторами [30] називають біопрепарати з нормальної мікрофлори, що використовуються для профілактики і лікування цього захворювання, еубіотиками. До них автори відносять препарати, що містять біфідо- і лактобактерії, *E.coli*, спорові форми бактерій. Однак Б.А. Шендеров з співавторами [30] вважають, що еубіотики – це термін, який використовується в основному російськими дослідниками і за своєю суттю охоплює лише частину пробіотиків.

На думку Б.А. Шендерова, пробіотики – це препарати і продукти харчування, до складу яких входять речовини мікробного і немікробного походження, які надають при природному способі введення сприятливі ефекти на фізіологічні функції і біохімічні реакції організму господаря через оптимізацію його мікробіологічного статусу. Це визначення передбачає, що будь-які живі або вбиті мікроорганізми, їх структурні компоненти, метаболіти, а також речовини іншого походження, що позитивно впливають на функціонування мікрофлори господаря, що сприяють кращій адаптації його до навколишнього середовища в конкретній екологічній ніші, можуть розглядатися як пробіотики [30].

Відсутність чіткого визначення препаратів цієї групи, очевидно, можна пояснити недостатньою вивченістю їх фармакодинаміки. Це стало можливим у зв'язку з тим, що більшість авторів відносили пробіотики до кормових

добавок. На підставі результатів багаторічних досліджень вважають, що пробіотики слід віднести до лікарських засобів, які краще використовувати для превентивної терапії і як ерготропіків. Загалом можна зробити висновок, що пробіотики – це стабілізовані культури мікроорганізмів і продукти їх ферментації, що володіють властивістю оптимізувати кишкові мікробіоценози, пригнічувати ріст і розвиток патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, підвищувати обмінні процеси і захисні реакції організму, активізувати клітинний і гуморальний імунітет.

П. Льонс та Р.Дж. Фаллон [42] назвали наш час «наступаючою епохою пробіотиків». І дійсно, численні дослідження з розробки нових біопрепаратів і подальше вивчення механізму їх лікувально-профілактичної дії дають підставу стверджувати, що в XXI ст. пробіотики в значній мірі потіснять на ринку традиційні і небезпечні для організму препарати, особливо ті, які застосовуються з профілактичною метою. В останній період поряд з пробіотиками у ветеринарній медицині застосовують пребіотики і синбіотики.

За даними А.І. Калмикової [43], до пребіотиків належать препарати немікробного походження, здатні надавати позитивний ефект на організм господаря через селективну стимуляцію зростання або активності нормальної мікрофлори кишківника. Пребіотиками, зокрема, є олігосахариди, наприклад фруктоолігосахаріди, активно стимулюють ріст біфідобактерій. Вважають, що при раціональній комбінації пробіотиків і пребіотиків можливий максимальний позитивний ефект.

Сьогодні науковці всіх країн світу проводять велику кількість досліджень, які доводять потенційних переваги пробіотичних бактерій для здоров'я людини. Вчені впевнені, що молочнокислі бактерії відіграють ключову роль у відновленні і підтримці балансу кишкової флори. Ці мікроорганізми також продемонстрували свою здатність підтримувати

природний захист організму живих істот. Зокрема, вчені вивчають їх благотворний вплив на зв'язок «мозок-кишківник» і метаболічний синдром.

У 2008 році стартував проект «Мікробіом людини», який фінансується Національним інститутом здоров'я США [44]. За данними цього проєкту, чисельність мікроорганізмів, які складають мікробіоту людини, приблизно у 10 разів перевищують кількість клітин в організмі в цілому, а їхній мікробіом (сукупний геном різних видів, що складають мікробіоту), більший за геном людини в 100-150 разів. Склад мікробіоти варіюється у досить широкому діапазоні – до 35 000 видів геномів.

Сучасні тенденції до переосмислення харчування людей і більш інтенсивне виробництво молочнокислих продуктів призводять до збільшення кількості досліджень і винаходів у цій галузі. Таким чином, можемо спостерігати велику кількість наукових праць і патентів від сучасних вчених. Серед великого списку патентів хочемо виділити декілька особливо цікавих і корисних для подальшого розвитку досліджуваної галузі біотехнології.

Одним з відомих патентів є російський патент під номером RU2428468C1 «Спосіб індивідуального підбору пробіотичних препаратів, які містять лактобактерії і/або біфідобактерії для елімінації умовно-патогених мікроорганізмів, виділених від пацієнта за дослідження на дисбактеріоз кишківника» [45]. Винахідники патенту – О. Орищак, А. Бойцов, Л. Нилова. Науковці стверджують, що їхній винахід забезпечує підвищення точності виявлення антагоністичної активності пробіотичних препаратів, спрощення посіву та обліку отриманого результату. У патенті заявляється особливий спосіб, який, на відміну від способу прототипу, дозволяє знизити ризик використання пробіотиків, що можуть пригнічувати власну індигенну мікрофлору даного пацієнта, оскільки відсутність визначення біосумісності підвищує ризик використання пробіотиків, які можуть пригнічувати власну індігенну мікрофлору даного пацієнта і призводити до дисбалансу кишкової мікрофлори, збільшуючи дисбіоз [45].

Іншим прикладом сучасного і актуального патенту є також російський винахід. Це патент В. Нечисляєва, Л. Скудаєвої, І. Павленко, Н. Башкирцевої під назвою «Спосіб отримання і контролю пробіотичних препаратів» [46]. Як свідчить документація патенту, винахід відноситься до мікробіології і може бути використаний у виробництві пробіотичних препаратів на основі лакто- і біфідобактерій. Запропонований спосіб включає в себе послідовні 3-кратні посіви бактерій на живильне середовище при приготуванні маткової культури, реакторне накопичення біомаси бактерій і визначення біологічних параметрів готового препарату. В якості живильного середовища використовують казеїново-дріжджову середу, що містить 20-25% дріжджового аутолізата і 10-15% казеїнового гідролізату. При приготуванні маткової культури бактерій 1-й і 3-й посів на казеїново-дріжджову середу чергують з посівом на іншу живильне середовище – МРС-1 для лактобактерій і модифіковану печінкову середу для біфідобактерій. Винахід забезпечує зниження витрат, уніфікацію поживних середовищ на етапах виготовлення та контролю препаратів, а також зниження витрат напівфабрикатів при приготуванні казеїново-дріжджовий середовища. Відмінними ознаками запропонованого способу отримання та контролю пробіотичних препаратів є: використання в якості поживного середовища казеїново-дріжджового середовища, що містить 20-25% дріжджового аутолізату і 10-15% казеїнового гідролізату від усього обсягу середовища. При цьому за приготування маткової культури бактерій посів на казеїново-дріжджеве середовище чергують з посівом на іншу живильне середовище, наприклад МРС-1 для лактобактерій і модифіковане печінкове середовище Блаурокка для біфідобактерій [46].

Третім патентом можливо виділити винахід під номером RU2164801C1 таких науковців, як А. Молокєєв, Л. Нікулін, Р. Ільїна, Е. Криниціна, Т. Карих, Н. Молокєєва, В. Байбаков, М. Андрєєва, Н. Соболєва [47]. Вони дослідили і винайшли «Препарат-пробіотик в сухій іммобілізованій формі».

Даний винахід також відноситься до біотехнології, а саме до препаратів медичного і ветеринарного призначення. Препарат включає носій, що представляє собою сорбент, і клітини прибутків, іммобілізовані на зазначеному носії. Клітини прибутків використовують спільно з живильним середовищем, а в якості сорбенту використовують матеріал з антацидними властивостями, розвиненою мезо- і макропористою структурою у вигляді порошку з розміром часток не більше 0,1 мм, або у вигляді гранул розміром 0,1-5,0 мм, або у вигляді пігулок. Препарат додатково містить захисне середовище, а клітини перебувають з живильним середовищем у сухому концентраті біфідобактерій на молочній основі з титром 108-1010 КУО / г і вмістом амінокислот (мг/100 г сухої біомаси): глутамінова кислота 15,0-68,0, глутамін 8,0-20,0, лейцин 10,0-50,0, аргінін 20,0-30,0, цистеїн 50,0-80,0, при наступному співвідношенні компонентів препарату в сухому вигляді, мас.%: клітини еубіотиків з живильним середовищем і титром 108-1010 КУО / г 0,1-10,0, захисне середовище 0,1-10,0, носій-сорбент та інше до 100%. Як захисне середовище використовують желатин, сахарозу, аскорбінову кислоту і хлористий натрій при наступному співвідношенні компонентів, мас.%: желатин 8,5-11,5, аскорбінова кислота 0,8-1,2, хлористий натрій 1,7-3,0, сахароза та інше до 100%. Препарат-пробіотик "ЕКОФЛОРА" в іммобілізованій формі має більш тривалий термін зберігання і більш ефективну пролонговану лікувально-профілактичну дію на всіх ділянках шлунково-кишкового тракту за рахунок більш високої колонізаційної активності [47].

В основу винаходу поставлена мета створення такого комплексного бактеріального препарату, який забезпечував би більш ефективну пролонговану лікувально-профілактичну дію на організм людини або тварини за рахунок збереження активності препарату при зберіганні і при введенні в організм на всіх ділянках шлунково-кишкового тракту [47].

Зазначена задача вирішується тим, що в комплексному бактеріальному препараті, що включає носій, який представляє собою сорбент і клітини еубіотиків, іммобілізовані на зазначеному носії, клітини еубіотиків використовують спільно з компонентами живильного середовища з біотитром 108 - 1010 КУО / мл. В якості сорбенту використовують матеріал з антацидними властивостями, розвиненою мезо- і макропористою структурою і обсягом макропор не менше 0,01 $см^3$ / г [47].

Серед іноземних патентів виділяється винахід під номером EP1243180A1, який носить назву «Probiotikum, probiotisches Lebensmittel, Verfahren zur Herstellung des Lebensmittels, Pharmazeutisches Präparat und Verwendung der probiotischen Kultur» («Пробіотик, пробіотична їжа, спосіб виробництва їжі, фармацевтичне приготування та використання пробіотичної культури») [48]. Світ дізнався про цей винахід завдяки німецьким дослідникам Інгеборгу Марі Жаклін Бове-Ауденховен та Рулофу Ван Дер Мееру. Даний винахід відноситься до пробіотиків. Відповідно до документації винаходу, це мікроорганізм, що продукує нізин (наприклад, *Lactococcus lactis*) або нізин, який містить композиція, отримана із зазначеного нізин-продукуючого мікроорганізму. Ця знахідка є досить дивною, оскільки хоча нізин, як відомо, має бактерицидні властивості, грамнегативні бактерії знищуються лише в тому випадку, якщо бактерії отримують додаткову обробку разом, наприклад, з EDTA. Пробіотик можна використовувати як інгредієнт в їжі (наприклад, сир), корм для птиці та фармацевтична композиція.

Корисним німецьким винаходом також є «PROBIOTISCHES ORALES GESUNDHEITSFÖRDERNDES PRODUKT» («Продукт-пробіотик для оздоровлення ротової порожнини) під номером EP 1978979 B1 [49]. Даний винахід розкриває композицію для догляду за порожниною рота, що містить комбінацію пробіотичних бактерій, вибраних з групи, що включає *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Neisseria*, *Veillonella* та компоненти, що

підвищують pH і / або буферність, які відновлюють мікрофлору порожнини рота, пов'язану з хорошою здоров'я порожнини рота у суб'єктів з порушеною мікрофлорою порожнини рота. Опис винаходу також розкриває застосування композиції для догляду за порожниною рота в комбінації з іншими продуктами, які сприяють здоров'ю порожнини рота, щоб допомогти суб'єктам, які страждають такими розладами, як сухість у роті, карієс, неприємний запах з рота, запалення слизових оболонок порожнини рота або грибкові інфекції порожнини рота, для відновлення здоров'я порожнини рота [49].

Останнім часом дуже трендовими і актуальними стають еко-продукти. Звісно, науковці не стоять на місці і вкладають свої знання в речі, які користуються широким попитом. Таким чином виник такий винахід, як «Herbal and pharmaceutical drugs enhanced with probiotics» («Трав'яні і фармацевтичні препарати, посилені пробіотиками» [50]. Цей препарат запатентували американські науковці – М.С. Редді, Г.В. Прасад. Документаційний опис патенту засвідчує, що лікувальна дія засобів, в тому числі лікувальних трав, алопатичних засобів і засобів пародонту, посилюється і прискорюється при введенні таких ліків в комбінації або в поєднанні з пробіотиками, особливо з пробіотиками роду *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Penicillium* і сахароміцети.

Науковці пропонують покращений препарат лікарського засобу, який має відому ефективність при відомій терапевтичній дозі при лікуванні захворювання або розладів у людей і тварин. При цьому покращення забезпечує саме життєздатний пробіотик у сполученні з терапевтичною дозою вказаного лікарського засобу в кількості, достатній для підвищення відомої терапевтичної ефективності лікарського засобу. Останній вибрано з групи, що складається з лікарських рослин, алопатичних препаратів, пародонтальних препаратів і їх комбінацій, але виключаючи групу, що

складається з антибіотиків, антитіл і лікарських засобів, що пригнічують життєздатність пробіотика [50].

25 листопада 2019 р. у Києві відбулася Науково-практична конференція «Місце пробіотиків у здоров'ї дитини від народження до підліткового періоду» за участю відомих у науковому світі лекторів. Захід організовано за підтримки фармацевтичної компанії «Sandoz» [51].

Розгляд основоположних питань утворення та розвитку мікробіоти кишківнику, її вплив на людський організм протягом усього життя, визначення основних чинників, які мають негативний вплив на розвиток дисбактеріозу, висвітлив професор Рок Орел, завідувач відділення гастрології і ентерології, гепатології та харчування Дитячої лікарні Університетського медичного центру міста Любляни, Словенія. Разом з тим, Рок є професором педіатрії факультету медицини та харчування біотехнічного факультету у місті Любляни [52].

Великий інтерес суспільства і науковців до проблем харчування і впливу пробіотиків на здоров'я організму людини свідчить про те, що це питання є актуальним і потребує подальшого дослідження. Тисячолітня історія розвитку біфідобактерій і стабільне поширення кисломолочних продуктів серед людського населення доводить важливість цих мікроорганізмів для здоров'я та існування людей загалом. Сучасним представникам науки слід більш ефективно застосовувати різні методи дослідження пробіотиків і сприяти розвитку біотехнології в цьому напрямку, адже позитивний вплив пробіотиків на організм людини вже не викликає жодних сумнівів.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Об'єкти і методи дослідження

2.1.1 Об’єкти дослідження

Об’єктом нашого дослідження стали культури пробіотичних мікроорганізмів, які придатні до відбору на певних селективних середовищах та подальшого промислового культивування. В умовах виробництва на молокопереробному підприємстві ПрАТ «Лакталіс-Миколаїв Україна» міста Миколаєва Миколаївської області у співпраці з компанією DANISCO (виробником заквасок) нами було досліджено мікроорганізми, що різняться за біохімічною активністю та умовами існування та розглянуто можливості створення на їх основі комплексних поліштамових пробіотиків.

Для експерименту було відібрані такі бактеріальні культури, як *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *L. Casei*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus*, *St. thermophilus*, *L. helveticus* та інші.

Окрім того, нами було досліджено селективні середовища (*Агар Streptococcus thermophilus (ST), MRS агар, pH-модифікований (pH 5,20, 4,58) MRSagar, MRS-ванкоміциновий агар, MRS-жовчний (0,2% та 0,5%) агар, агар MRS-NaCl, хлористий літієвий MRS агар, Агар MRS-NNLP, Посилений клостридіальний агар, Базальний агар, BA-мальтозний агар, BA-галактозний агар, BA-сорбітольний агар, BA-манітольний агар та BA-ескуліновий агар, Агар-лактат натрію (агар NaLa), арабінозний агар, ксилозний агар, рафінозний агар, PC-агар*) та з їх допомогою способи відбору (окремих видів чи асоціацій, які виживають на спільних для них селективних середовищах) необхідних штамів для культивування (*Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R і *Lactobacillus rhamnosus* CLR2, *Lactobacillus*

acidophilus, Bifidobacterium UABla-12, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus intermedius* і *Lactobacillus salivarius*). Було визначено, які з мікроорганізмів мають спільні умови культивування, не мають антагоністичної дії і визначено їх сумісний оптимум.

2.1.2 Методи дослідження

Впродовж досліджень нами було проведено порівняльну характеристику способів ферментації різних культур та визначено вплив способу засівання (із масштабуванням культур перед інокуляцією або внесенням інокуляту одразу безпосередньо в промисловий ферментер) різними культурами різні об'єми (від 1000 до 13000 л.) середовища.

Виготовлення пробіотиків – багатостадійний процес, що потребує точності у розрахунках на кожному етапі процесу. Наприклад, високої точності потребує розрахунок концентрацій селективного агента при відборі необхідних культур. Також важливим є вибір на основі розрахунку способів культивування, відбору, сушки, а також товарної форми готового препарату.

За загальною технологією промислового виробництва пробіотиків, чисту культуру, або препарат на її основі інокулюють на субстрат, де відбувається ріст культури. Додатково можливо вносити селективні агенти, що будуть додатково пригнічувати ріст контамінантних організмів. По закінченню лаг-фази, про що свідчить зміна біохімічних властивостей середовища (у випадку молочнокислих пробіотиків – pH 4,7-5,2), ферментацію завершують. Культуру концентрують та готують до заморозки. Після цього препарат фасують і реалізують. Варто зауважити, що процес виробництва пробіотиків включає заходи контролю, що передбачені міжнародними стандартами [53]. Загальна технологічна схема виробництва харчових пробіотиків зображена на рисунку 1 і дотримана нами.

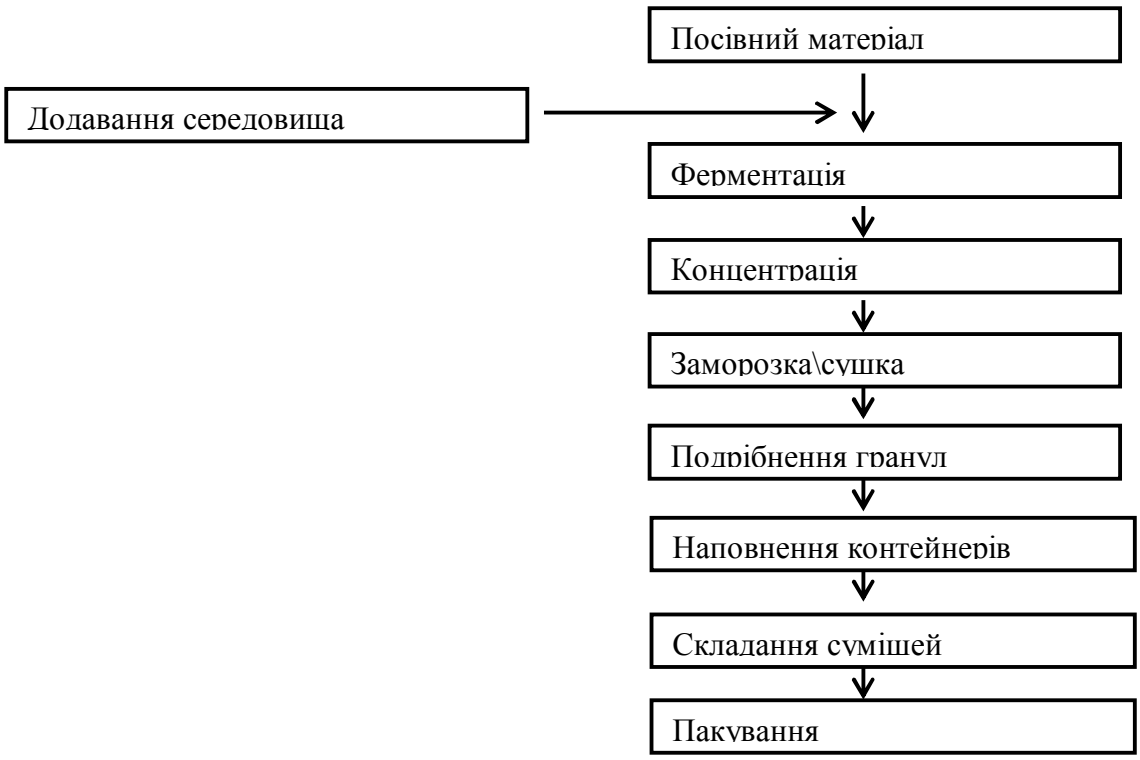

Рис. 1. **Загальна схема виробництва харчових пробіотиків**

На кожному з цих етапів можливо застосовувати різні технологічні прийоми, залежно від особливостей культури, її чутливості до певних елементів середовища, чутливості до температур та інших показників, кількості штамів, вимог стандартів та необхідного контролю, необхідних характеристик кінцевого продукту, тощо.

В ході роботи було проведено порівняльну характеристику способів консервування (кріоконсервація, ліофільна сушка) пробіотичних культур. Проаналізовано способи кріоконсервації (у банках, що занурені у рідкий азот гранулювання крапанням у рідкий азот) та ліофільної сушки (з живої свіжоотриманої культури, з попередньо заморожених культур) та визначено їх переваги та недоліки.

Мікробіологічними методами (підбором селективних середовищ під кожен вид) було виділено вищенаведені окремі культури та групи культур.

Після цього на промисловому обладнанні було протестовано вищенаведені методики інокуляції біооб’єкта з подальшим культивуванням, ферментацією у танках та концентруванням.

На ліофільній сушарці був виділений сублімат культури, а у рідкому азоті за різними методиками було отримано гранульований препарат.

2.2. Результати та їх обговорення

2.2.1 Методи відбору пробіотичних організмів

Першим етапом виробництва пробіотичних препаратів та заквасок є відбір культур, що в подальшому будуть культивовані і приведені у товарну форму. Ключовим етапом у відборі культур для промислового культивування є вибір середовища з селективним фактором для одного, або декількох пробіотичних штамів.

В процесі відбору культур ми враховували характерні особливості необхідних штамів, такі як:

- спосіб дихання (аеробні, або анаеробні);
- оптимальні умови росту (мезофіли або термофіли);
- метаболічна активність (гомоферментативні, гетероферментативні);
- протеолітична активність (повільна, середня);
- швидкість росту;
- продукування екзополісахаридів.

В результаті відбору, нам вдалося виділіти декілька провідних пробіотичних мікроорганізмів, що входять до складу більшості існуючих препаратів та заквасок. Кожен з них має оптимальні показники щодо вищеперерахованих властивостей і є вигідним для вирощування.

За способом дихання з облігатних анаеробів ми відібрали бактерії роду Lactobacillus, а до факультативних анаеробів – *St. thermophilus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* [54]. Серед мезофільних мікроорганізмів ми обрали *Lactococcus*, *Leuconostoc*, а з термофільних *Lactobacillus*, *St. thermophilus*.

В ході експерименту, як і очікувалось, було визначено, що гомоферментативні організми, такі як *Lactobacillus*, наприклад *acidophilus*, *plantarum*, *bulgaricus*, а також *St. thermophilus*, *Lactococcus* продукують в основному молочну кислоту. Натомість, Гетероферментативні організми, як *Lactobacillus casei*, *rhamnosus*, *brevis*, *fermentum*, *Leuconostoc* окрім молочної кислоти продукували вуглекислоту, ацетон, диацетил та інші речовини.

Підтверджено, що повільною протеолітичною активністю володіють *Lactococcus*, *St. thermophilus*, *Leuconostoc*, а середньою – а *L. helveticus*, *L.Casei*.

Рівень вироблення клітинами екзополісахаридів ускладнив процес концентрування і очищення клітин, тому ми прийняли рішення обрати штами з низьким рівнем їхнього синтезу. Відомо, що штами з високим рівнем синтезу екзополісахаридів є серед лактобацил та лактококів, а також *St. Thermophillus*. Проте, екзополісахариди надавали сприятливий вплив на антагоністичні властивості культур до патогенної мікрофлори. Помітного впливу на культури штамів одного виду організмів, що виробляють ЕПС не виявлено.

Зазвичай мезофільні організми володіють низькою швидкістю росту культури. Культури досягали фази сповільнення росту через 8–18 год., в той час, як термофільні значно швидше досягали максимуму у рості (7-14 год.).

Добір штамів за цими характеристиками дав нам можливість лімітувати ріст небажаних клітин та в комплексі з іншими факторами середовища виділити необхідну культуру чи культури. В той же час, балансуючи даними властивостями, ми маємо змогу створити комплексні біопрепарати, які повністю або частково сумісні за властивостями росту. Зазвичай це стосується комплексних кисломолочних заквасок, до яких входять як мезофільні, так і термофільні організми, що лімітуються в процесі роботи закваски при нижніх для термофільних та верхніх для мезофільних організмах порогах температур (34-36 ^{o}C).

Не менш важливим завданням було поєднати культури основної закваски з культурою власне пробіотика, адже культури комплексних препаратів не повинні взаємолімітувати одна одну. Саме для цього ми провели ретельний аналіз та випробували поліштамові закваски і пробіотики.

Окрім загальної біохімічної сумісності культур, культура пробіотика у кисломолочній продукції повинна залишатись активною протягом всього терміну придатності продукту. В той же час культура не буде вважатись пробіотиком, якщо кількість її клітин на 1 мл продукту (кое) буде недостатньою. Наприклад, для пробіотика Howaru BIFIDO ця кількість – не менше $1 \cdot 10^7$ кое\мл. Дана культура вноситься окремо і не заважає роботі основної закваски та не пригнічується нею. Це зразок правильного поєднання культур у готовому продукті, що містить пробіотик.

Не менш важливий фактор при відборі штамів – селективне середовище. Для відбору певного одного штаму пробіотичних організмів ми використали спеціально підібране середовище, що відповідає його біохімічному оптимуму. Більш ускладненим процесом стало складання середовища для відбору декількох штамів для створення поліштамових пробіотиків, що зможуть співіснувати та не впливати негативно на активність один одного [55].

Для продовження експерименту ми виділили декілька живильних середовищ, які придатні для відбору пробіотичних бактерій. Бактеріологічний пептон і водний розчинник (0,15%) підготували розчиненням 1,5 г бактеріологічного пептону в 1 л дистильованої води. pH довели до 7,0±0,2, з подальшим автоклавуванням 9 мл аліквот при 121 °C протягом 15 хв.

Утворений MRS агар ми в подальшому використовували для приготування багатьох живильних середовищ для різних методів відбору пробіотичних організмів.

Агар Streptococcus thermophilus (ST). Цей агар є стандартний, тому його готують за методикою, описаною Дейвом і Шахом у 1996 р.

MRS агар, pH-модифікований (pH 5,20, 4,58) MRSagar, MRS-ванкоміциновий агар, MRS-жовчний (0,2% та 0,5%) агар, агар MRS-NaCl та хлористий літієвий MRS агар. Регідратований відвар MRS (Oxoid) ми готували відповідно до інструкцій виробника DANISCO. pH відвару доводили до 5,20 і 4,58, використовуючи 1,0 M HCl до отримання pH-модифікованого агару. 2,5 грамів чистої солі жовчі/л ми додали для отримання 0,2% та 0,5% MRS-жовчного агару. 40 грамів NaCl на літр середовища додавали для агару MRS-NaCl (кінцева концентрація 4%) та 5 г/л хлориду літію (LiCl) додали для агару MRS-LiCl (кінцева концентрація 0,5%).

Для приготування MRS-ванкоміцинового агару (MRS-V), 2 мл 0,05 g/100 мл розчину ванкоміцину ми додали до 1 л відвару MRS до отримання кінцевої концентрації 1 мг/л. Порошок агару додавали до кожного бульйону з розрахунку 1,2% та автоклавували середовище при 121°C протягом 15 хв. Інокульовані пластини у двох примірниках інкубували анаеробно при 37 °C і 43 °C протягом 72 год.

Агар MRS-NNLP. MRS-налідиксову кислоту, неоміцин сульфат, хлорид літію та паромоміцин сульфат агар ми змішали та готують відповідно до методу, описаного Лароєю та Мартіном у 1991 р. Агар MRS був базальним середовищем. Відфільтрований NNLP безпосередньо перед наливанням додали до стерилізованої в автоклаві MRS бази. Також одночасно додавали відфільтрований L-цистеїн-HCl, (0,05% остаточної концентрації) для зниження окисно-відновного потенціалу середовища а також для посилення росту анаеробних біфідобактерій. Після цього ми інокульовані пластини у двох примірниках інкубували анаеробно при 37 °C протягом 72 год.

Посилений клостридіальний агар виготовили за даними інструкції виробника DANISCO та стерилізували автоклавуванням при 121 °C протягом 15 хв.

Базальний агар, BA-мальтозний агар, BA-галактозний агар, BA-сорбітольний агар, BA-манітольний агар та BA-ескуліновий агар. Для приготування базального агару ми використали такий склад: 10 г. триптону, 10 г порошку Lab lemco, 5 г дріжджового екстракту, 1 г емульгатору Твін 80, 2,6 г K_2HPO_4, 5 г ацетату натрію, 2 г триамоній цитрату, 0,2 г $MgSO_4*7H_2O$, 0,05 г $MnSO_4*4H_2O$, 12 г бактеріологічного агару та 1 л дистильованої води і згодом автоклавували його при 121°C протягом 15 хв. Десять мілілітрів мембранно відфільтрованих стерильних 20% розчинів мальтози, галактози, сорбіту, манітолу або ескуліну ми додали до 90 мл базального агару (2% кінцева концентрація) безпосередньо перед заливкою агарового середовища. Знову ж таки, інокульовані пластини у двох примірниках інкубували аеробно та анаеробно при 37 °C і 43 °C протягом 72 годин.

Агар-лактат натрію (агар NaLa), арабінозний агар, ксилозний агар та рафінозний агар. Він є основою для приготування цих агарових середовищ і складається з 10 г штучно панкреатично перетравленого казеїну, 10 г дріжджового екстракту, 2 г пірувату натрію, 2 г гліцину, 1,5 г хлориду натрію, 0,5 г Твін 80, 0,25 г дікалій гідрофосфату, 12 г бактеріологічного агару та 1 л дистильованого води. В процесі приготування ми довели pH речовини до 7±0,2, використовуючи 1 M HCl і 10 M NaOH. Для виготовлення агару NaLa перед автоклавуванням ми додали 10 г лактату натрію. Середовище автоклавували при 121 °C протягом 15 хв. Для інших середовищ 10 мл 10% мембранної фільтрованої арабінози, рафінози або ксилоли ми додали до 90 мл автоклавованого середовища (1% кінцева концентрація) перед заливанням пластин. Засіяні планшети в двох екземплярах інкубувалися анаеробно при 30 °C протягом 7-9 днів.

РС-агар виготовляли з використанням описаного способу Равулою та Шахом у 1998 р. Інкубація була проведена в анаеробних умовах при 27 °С протягом 72 год.

В результаті експерименту нами було виявлено, що ST-агар підходить для *S. Thermophilus*. В свою чергу, *S. thermophilus* утворювала крихітні (0,1-0,5 мм) колонії в агарі ST при 37 °С в умовах аеробної інкубації через 24 год. Час інкубації був недостатнім для зростання інших культур, навіть якщо ST-агар не пригнічував ріст інших організмів. Отже, ST-агар на 37 °С протягом 24 годин і аеробні умови були селективними для *S. Thermophilus*.

Інші організми, такі як *L. casei*, *L. rhamnosus* і *L. acidophilus* ми виростили на всіх середовищах на основі цукру. Біфідобактерії не росли ні в одному середовищі, крім БА-ескулінового агару. Нам вдалося спостерігати, що *Propionibacterium freudenreichii ssp. Shermanii* росли тільки на агарі MRS і ВА-галактозному агарі.

Разом з тим, усі організми, крім *Bifidobacterium spp*. росли в агарі МРС. Коли pH агару MRS ми зменшили до 5,20 та температура інкубації підвищили до 43 °С, лише *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (який утворює 1,0 мм, білі шорсткі неправильні колонії), *L. rhamnosus* (який утворює 2 мм, блискучі гладенькі білі колонії) та *L. acidophilus* (які утворюють від 0,1 до 0,5 мм, коричневі, шорсткі неправильні колонії) відзначилися значним ростом. Коли ми знизили pH агару MRS до 4,58 з використанням 1 М HCl, лише *L.delbrueckii ssp. bulgaricus* та *L. rhamnosus* показали хороший ріст, подібний до того, що спостерігався в агарі MRS при pH 5,20, а ріст *L. acidophilus* інгібувався, за винятком штаму DS 910.

Таким чином, ми визначили, що агар MRS при pH 5,20 при анаеробній інкубації при 43 °С може бути селективним щодо *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* якщо *L. rhamnosus* та *L. acidophilus* під час експерименту були відсутні у продукті. Морфології колоній *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* та *L. rhamnosus*

дуже різні, і ці два організми можна легко диференціювати, якщо в продукті був присутній *L. Rhamnosus*.

Отже, можемо зробити висновок, що pH модифікований MRS (pH 4,58) агар та анаеробна інкубація при 43 °C можуть бути використані для відбору *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* з продукту. *L. casei* росте у MRS-NaCl (4%), MRS-LiCl (0,5%) при 37 °C при анаеробній інкубації та LC агарі. Ми визначили, що *L. casei* не росте на агарі NNLP та при 43 °C. Нижча температура інкубації (≤37 °C) підтримує ріст *L. casei*. *L. casei* та *L. rhamnosus* стійкі до 1 мг ванкоміцину / л. *L. rhamnosus* формує добре розвинені гладкі білі диски, як колонії розміром 2 мм і більше в діаметрі в агарі MRS-ванкоміцину (MRS-V) при 37 °C в анаеробній інкубації. В той же час, *L. rhamnosus* росте при температури інкубації від 37 °C до 43 °C майже на всіх середовищах на основі цукру в аеробних та анаеробних умовах, за винятком агару MRS-NNLP, але показує різну картину росту (між штамами) у MRS-жовчному агарі та Агарі MRS-LiCl. Організми ростуть добре в агарі MRS-V при температурі інкубації 37 °C і 43 °C, як і в агарі LC при 27 °C. Агар MRS-V при 43 °C і анаеробна інкубація підтримує ріст лише *L. Rhamnosus*.

В ході дослідження було доведено, що базальний агар, БА-сорбітольний агар та БА-манітольний агар в аеробній інкубації при 43 °C та вони ж при 43 °C та анаеробній інкубації також підтримують ріст лише *L. rhamnosus*. Отже, агар MRS-V при 43 °C в анаеробній інкубації ВА-сорбітольний агар або ВА манітольний агар при 43 °C, або в аеробному, або в анаеробному режимі інкубації, можуть бути селективними щодо *L. rhamnosus*. З'ясовано, що агар MRS-V при 37 °C або агар LC при 27 °C в анаеробному режимі інкубації може бути селективним для *L. Casei*, коли *L. rhamnosus* відсутній у продукті. Коли був присутній *L. rhamnosus*, загальне число *L. casei* та *L. rhamnosus* ми отримували, використовуючи агар MRS-V при 37° C та анаеробній інкубації протягом 72 год. Кількість *L. rhamnosus* на

агарі MRS-V при 43 °C та анаеробній інкубації протягом 72 год можна відняти від загальної суми підрахованих *L. casei* та *L. rhamnosus* для отримання числа *L. casei*. Таким чином, ми змогли отримати поліштамову пробіотичну культуру з близькими вимогами до умов середовища.

Інше середовище – Агар MRS-NNLP – при 37 °C та анаеробній інкубації підтримувало зростання лише біфідобактерій. Коли L-цистеїн був відсутній в середовищі, ми не спостерігали ріст біфідобактерій і вони не утворювали чітких колоній. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що агар MRS-NNLP з 0,05% L-цистеїном та анаеробна інкубація при 37 °C є селективним середовищем для біфідобактерій і вмістом L-цистеїну можна контролювати ріст біфідобактерій в інших середовищах, що є важливим для складання композицій штамів у різних співвідношеннях, перевіряти їх на сумісність та знаходити оптимальні кількості та ефективні співвідношення пробіотиків.

Використовуючи Агар NaLa, арабінозний агар, рафінозний агар та ксилозний агар, ми дізналися, що вони підтримують ріст *L. casei*, *L. acidophilus* та *L. rhamnosus* а також пропіонібактерій. У цих середовищах *L. casei* та *L. rhamnosus* утворили білі блискучі гладкі колонії діаметром 1 мм. Пропіоновокислі бактерії утворили колонії діаметром 0,5 мм в усіх середовищах. Однак у агарі NaLa ці мікроорганізми утворили колонії, які були тьмяно-коричневими зі світлішими краєм від 1,0 до 2,5 мм у діаметрі. Отримані колонії дуже відрізнялися від тих, що утворені *L. casei* та *L. rhamnosus*. В свою чегу, *L. acidophilus* утворював чітко означені колонії. Правильні колонії *Propionibacterium* утворилися лише через 72 год інкубації і через 7 днів розмір досліджуванлї колонії зріс до 2 мм в діаметрі. Розміри колоній *L. casei* та *L. rhamnosus* були незмінні.

У агарі NaLa морфологія та розмір колонії достатньо відрізнялись від тих, що утворилися в ході експерименту в арабінозному та ксилозному агарі. Таким чином, ми зробили висновок, що агар NaLa можна використовувати

для відбору пропіоновокислих бактерій. *Propionibacterium* також були підраховані після виявлення шляхом віднімання підрахунків *L. casei* та *L. rhamnosus* на 3 день із загальної кількості *L. casei*, *L. rhamnosus* і *Propionibacterium*, отримані з використанням агару NaLa, рафінозного або ксилозного агару.

В процесі експериментів ми встановили, що *L. acidophilus* є найважчим для виділення. *L. acidophilus* також підтримує ріст *L. casei* та *L. rhamnosus*. При підвищенні температури інкубації до 43 °C, *L. casei* було ліквідовано, однак *L. rhamnosus* все ще були здатні формувати колонії діаметром до 1,5 мм, а *L. acidophilus* утворили менші колонії (0,1-1,0 мм залежно від використовуваного цукру). Ми спробували застосувати галактозу і помітили, що біфідобактерії утворили точкові колонії за відсутності L-цистеїну, і колонії можна сплутати з *L. acidophilus*. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* та *S. thermophilus* утворювали колонії в агарі MRS при інкубації анаеробно при 43 °C. Тому ми вважаємо, що MRS агар та анаеробна інкубація при 43 °C можуть бути використані для виділення *L. acidophilus*, коли *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* та *S. thermophilus* у продукті відсутні.

При інкубації анаеробно при 43 °C у BA-манітольному агарі, BA-сорбітольному агарі, BA-ескуліновому агарі та BA-мальтозному агарі, *L. rhamnosus* утворила великі (діаметром 2,0-2,5 мм) гладкі блискучі диски, як колонії, тоді як *L. acidophilus* утворює менші (діаметром від 0,1 до 1,0 мм) грубі тьмяні колонії. Також хочемо відзначити, що BA-мальтозний агар підтримує ріст *L. acidophilus* більше, ніж інші BA агарові середовища при цій температурі інкубації, але один штам *L. acidophilus* DS 910 утворив великі колонії, які можна сплутати з *L. rhamnosus*. У MRS агарі, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. rhamnosus* та *L. acidophilus* утворили колонії, поки у BA-мальтозному агарі їх змогли утворити лише *L. acidophilus* та *L. rhamnosus*.

L. rhamnosus відзначився великими (2,0 до 2,5 мм у діаметрі) гладкими, блискучими та подібними до дисків колоніями, в той час як штами *L. acidophilus* утворили менші шорсткі коричневі колонії діаметром від 0,1 до 1,0 мм, які можна легко розрізнити. Тому MRS агар при аеробній або анаеробній інкубації при 43 °C можна використовувати для виділення *L. acidophilus*, крім DS 910, коли *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* не було в продукті.

За присутності *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ми використовували BA-мальтозний агар та анаеробну інкубацію при 43 ° C і лише невеликі грубі буруваті колонії віднесли до *L. acidophilus*. Селективні середовища для розділення *L. Acidophilus* та інших штамів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Селективні середовища для розділення лактобацил та біфідобактерій, в т.ч. *L. Acidophilus*

Вид пробіотика	Середовище для культивування штаму окремо	Селективне середовище
Lactobacillus acidophilus	MRS нейтральне	MRS Biokar + кліндаміцин та кіпрофлоксацин
Lactobacillus paracasei paracasei	MRS нейтральне	Середовище Melezitoze
Lactobacillus rhamnosus	MRS нейтральне	Середовище Melezitoze
Bifidobacterium lactis	RCM нейтральне	MRS DCL або середовище TOS

Серед середовищ, протестованих на *L. acidophilus*, BA-сорбітний агар дав найкращий результат. У цьому середовищі *L. casei* та *L. rhamnosus* утворили блискучі, великі, гладкі і білі колонії, тоді як усі штами *L. acidophilus* сформували грубі тьмяні, дрібні та коричневі колонії [61]. Тому

ми впевнені, що лише невеликі тьмяні грубі буруваті колонії слід перерахувати як кількість *L. Acidophilus* і використовувати для виділення культури. Також добрі результати у селективності до *L. acidophilus* показали середовища з антибіотиками, що є важчими у приготуванні, але ефективнішими за ВА агар.

Отже, здійснюючи оцінку біооб'єктів на основі моделей ферментації цукру, використанні інгібуючих речовин (такі як кислота, жовч, сіль та антибіотики), різних температур інкубації (27, 30, 37, 43 та 45 °С), умов інкубації (таких як аеробні та анаеробні) і тривалість інкубації (24, 72 год. або 7-9 днів), ми змогли визначити вплив того чи іншого середовища на розвиток певного виду, штаму, або групи штамів бактерій. Застосовуючи цей експериментальний досвід, ми отримали можливість виділяти штами мікроорганізмів для створення нових поліштамових препаратів пробіотиків, складаючи композиції корисних мікроорганізмів.

Проте сьогодні виробництво пробіотиків набуло промислового масштабу. Саме тому існує необхідність розробки нових більш дешевих і надійних селективних середовищ для скринінгу необхідних штамів. У таблиці 2 наведено селективні середовища, що використовуються компанією DANISCO, яка є одним з світових лідерів у виробництві кисломолочних заквасок та пробіотиків [59].

Таблиця 2

Селективні середовища для пробіотиків компанії DANISCO

Вид пробіотика	Селективне середовище				
	M17 Biokar	MRS Biokar (pH 5,4)	MRS Biokar + кліндаміцин / кіпрофлоксацин	Melezitoze	MRS DCL або TOS
1	2	3	4	5	6
Streptococcus thermophilus	Ріст	-	-	-	-

Продовж. табл.1

1	2	3	4	5	6
Lactobacillus bulgaricus	-	Ріст	-	-	-
Lactobacillus lactis	-	Ріст	-	-	-
Lactobacillus acidophilus	-	Ріст	Ріст	-	-
Lactobacillus rhamnosus	-	Ріст	-	Ріст	-
Lactobacillus paracasei paracasei	-	Ріст	-	Ріст	-
Bifidobacterium lactis	-	-	-	-	Ріст

2.2.2 Технології ферментації при виробництві пробіотиків

Після виділення штаму, або штамів внаслідок культивування на селективних середовищах, наступним етапом нашого дослідження є ферментація поживних середовищ мікроорганізмами у промислових ферментерах для розмноження культур та подальшого концентрування. Найчастіше у ферментери вносять заморожені препарати культур для розмноження і створення нових партій препарату. Цей процес потребує додаткового мікробіологічного контролю.

На даному етапі технології можуть відрізнятися складом поживного середовища, способом внесення біооб’єкту, умовами процесу, контролем параметрів та системою культивування [69].

Запас заморожених клітин, який попередньо був ретельно підготовлений, щоб складатися з одного чистого штаму, або декількох подібних і був перевірений на відсутність забруднень при контролі якості, ми

використали в обмеженій кількості послідовних ферментацій клітин для досягнення бажаного об’єму інокуляту і в кінцевому підсумку перенесли в основний промисловий ферментер для ферментації та, як наслідок, нарощення біомаси.

Альтернативна методика – заморожений матеріал для DVI (Direct Vat Inoculation – пряма інокуляція в чан) складається з більшої кількості концентрованих клітин, що ми можемо використати для прямої інокуляції в основний ферментер. Метою обох підходів є обмеження кількості поколінь від посівного фонду до продукту, тим самим знижуючи будь-який потенційний ризик генетичного дрейфу.

Термічно оброблене поживне середовище, що використовується для збільшення кількості клітин і основного бродіння, являє собою суміш води, джерел азоту, вуглеводів, солей і мікроелементів, необхідних для росту. На молокопереробному підприємстві з цією метою використовують пастеризоване знежирене молоко.

З огляду на важливість поживного середовища для виробництва пробіотиків, зміни в сировині можуть надати глибокий вплив на ріст і продуктивність. Залежно від потреб в живленні і чутливості штамів, варіювання партій в комплексних сирих інгредієнтах іноді може залишитися непоміченим, а іноді даати поітні зміни в активності продуцента.

При цьому ми вже довели, що деякі штами мають стабільні характеристики, в той час як на ефективність інших штамів це більш очевидно впливає позитивним, або негативним чином. З більш складними інгредієнтами, такими як дріжджові екстракти, відмінності, відповідальні за зміну ефективності штаму, не можуть бути легко обґрунтовані амінокислотним або пептидним розподілом за розміром, рівнями вітамінів, нуклеотидів, солей і вуглеводів, а скоріше пояснюється присутністю або відсутністю деяких інших невідомих або менш очевидних компонентів. Бурякова і очеретяна патока ми можемо використовувати для вирощування

хлібопекарських дріжджів, які будуть застосовуватися для виробництва дріжджових екстрактів і пептонів для харчових застосувань і ферментації.

З іншого боку, ми з'ясували, що перенесення компонентів, що використовуються для культивування дріжджів для отримання дріжджових екстрактів і пептонів, може не мати очевидного впливу на продуктивність штаму або може впливати на продуктивність пробіотичних штамів позитивним або негативним чином (в залежності від штаму). Крім того, очеретяна меляса може бути отримана з усього Світу з ефективністю і якістю, які можуть мати тривалий ефект при застосуванні у бродінні з дріжджовими екстрактами і пептонами.

Тож на даному етапі для нас важливим є не лише підбір правильного поживного середовища, а й постачальника, що може презентувати якісний продукт, що забезпечить чистоту і продуктивність ферментації.

Ферментація на підприємстві ПрАТ «Лакталіс-Миколаїв Україна» ретельно контролюється, і після завершення ферментації в основному резервуарі ми концентрували клітини шляхом їх відділення від відпрацьованого середовища за допомогою центрифугування чи інших методів (фільтрування, осадження).

2.2.3 Технології консервування пробіотиків

На даному етапі виробництва вибір способу консервування несе важливе значення, оскільки кожен спосіб специфічно впливає на якості продукту, виживаність мікроорганізмів та можливості застосування продукту у тій чи іншій сфері.

Ми дослідили, що тривале зберігання бактерій зі збереженням цінних властивостей загалом засноване на пригніченні обмінних процесів, що відбуваються в клітині. До таких способів відносяться кріоанабіоз мікроорганізмів і висушування бактерій із замороженого стану (ліофілізація).

Ефект консервації при сублімації досягається шляхом зниження активності води шляхом видалення вільної вологи в умовах субнулевих температур [54].

В ході експерименту, залежно від кінцевого застосування продукту, перед заморожуванням до концентрованої суспензії ми додали розчини стабілізаторів: кріопротектори та ліопротектори. Кріопротектори пригнічили швидкість росту льоду при заморожуванні, збільшуючи в'язкість розчину і зберігаючи аморфну структуру льоду в безпосередній близькості від клітини. Ліопротектори стабілізували структуру ліпідного бішару клітинної мембрани за відсутності води. В якості кріо- і ліопротекторів ми використали стандартні комплекси вуглеводів і пептидів.

Як тільки пробіотичний концентрат змішують з розчином кріопротекторів, можна застосовувати різні процеси заморожування.

При заморожуванні для захисту біомаси ми застосували середовища на основі цукрів та солей-кріопротекторів. Також як контроль використали стандартне середовище з сахарози і натрію лимоннокислого. У присутності в середовищі натрію лимоннокислого відбулися оборотні ушкодження амінокислотної транспортної системи клітини, сахароза підвищила в'язкість середовища, знижуючи швидкість руху молекул води і зневоднення мембран.

Концентровану біомасу ми змішали з захисним середовищем у рівних співвідношеннях і заморозили при температурі мінус 18-22 ^{o}C. Після реактивації замороженого препарату кількість життєздатних клітин знизилася. Тому зробимо висновок, що для мінімізації втрат клітин нам необхідно застосовувати якісні та чітко підібрані середовища, що іноді може бути економічно невигідним.

Екзополісахариди (ЕПС), що виробляються бактеріями, мають гідрофільні властивості, що сприяє додатковому підвищенню в'язкості середовища. ЕПС в бактеріальній клітині виконують захисну функцію, запобігаючи висиханню. Заморожування і висушування високопродуктивних ЕПС-синтезуючих культур можливі без додаткових протекторів, однак

стійкість таких препаратів при тривалому зберіганні і реактивації не доведена досвідом компанії Лакталіс та вимагає подальшого вивчення.

Достовірно відомо, що чутливість різних видів мікробів до заморожування-відтавання неоднакова. У літературі є відомості, що грамнегативні бактерії більш чутливі до заморожування, ніж грампозитивні. З грампозитивних мікробів найбільшою стійкістю володіють коки. Подібне розходження, ймовірно, пов'язано з особливостями будови клітинної стінки. Навіть в межах одного виду різні штами показують неоднакову чутливість до низьких температур.

Загалом технічний процес зводиться до того, що як тільки пробіотичний концентрат змішують з розчином кріопротектора, за класичним способом заморожування полягає в розливанні кріозахищеного концентрату в банки і зануренні закритих банок в ванну з рідким азотом, що було здійснено в ході дослідження. У подальшому заморожені банки можуть бути відправлені компаніям, що використовують пробіотики в продуктах харчування, або використовуватись компанією виробником для власного застовування.

Альтернативно, більш продуктивним методом виявився гранулювання кріозахищеного концентрату шляхом капання концентрату через калібровані отвори до ванни з рідким азотом. Перевіряючи цей метод, ми з’ясували, що гранули, які зазвичай представляють собою сфери діаметром 4-5 мм, потім збирають на дні і, упаковують в пакети, що зберігаються і відправляються при температурі в діапазоні від -45 до -55 °С. Такі закваски використовуються компанією Лакталіс для виробництва кисломолочних продуктів, наприклад сметан.

З переваг кріогенного зберігання хочемо виділити малу кількість технологічних операцій і контрольних критичних точок, що підвищують ймовірність вторинного обсіменіння культур, забезпечення сталості властивостей мікроорганізмів і доступність компонентів для підготовки

протективного середовища. До недоліків даного способу ми можемо віднести відносно коротку тривалість зберігання. Максимальний рекомендований термін становить 12 міс.

Висушування біоматеріалів із замороженого стану (ліофілізація, сублімаційні висушування, заморожування-висушування) – широко поширений спосіб, в процесі якого вода випаровується в умовах вакууму без відтавання льоду, що дозволяє повністю зберігати первинну структуру об'єкта сушіння. При використанні даного способу багато фізіологічно різнорідних видів бактерій і бактеріофагів вдається зберігати в життєздатному стані 50 років і більше [62].

Ліофілізацію ми проводили після концентрування біомаси бактерій шляхом центрифугування протягом 20 хв при частоті 3000 об. / хв. Далі біомасу в асептичних умовах змішали із захисним середовищем у співвідношенні 1 : 1 і заморозили при температурі мінус 20 ºС.

Після повного заморожування біомасу висушили за дотриманням наступних умов: p = (0,01-0,03) атм., t = -50,3 – -51,2 ºС, τ = 28 год. Кількісні показники по виходу концентрованої біомаси за даними досліджень розглянуті в таблиці 3.

Таблиця 3

Кількісні показники біомаси на різних етапах ліофілізаційної сушки

Об’єкт дослідження	Маса, г	Кількість життєздатних клітин, к.о.е./мл (г)
Біомаса	500±0,4	$3 \cdot 10^{10}$
Концентрована біомаса	200±5,6	$4 \cdot 10^{11}$
Заморожена біомаса	400±8,4	$6 \cdot 10^{10}$
Висушена біомаса	48,3±3,5	$7 \cdot 10^{12}$

Масова частка вологи у висушеному препараті становила 4±0,01%. Вихід сухої біомаси склав 10% від початкового кількості; цю величину науковці компанії відносять до економічних показників процесу. При ферментації сировини або нарощуванні клітин біомаса мікроорганізмів є

продуктом «реакції», вона ж буде і «вихідним реагентом». У біотехнології використовують метаболічні показники, що характеризують щільність популяцій бактерій.

Вуглеводи стабілізують структуру білків шляхом утворення водневих зв'язків. Дисахариди знижують температуру фазових переходів ліпідів клітинної мембрани, зберігаючи її властивості, як в гідратованій клітині. Цілісність клітинної мембрани – необхідна умова виживання клітини. У препаратах з низьким відсотком виживання при регідратації ми виявили підвищений вміст внутрішньоклітинних ферментів, нуклеїнових кислот.

Вважається, що вуглеводи як речовини, здатні набувати склоподібного стану при заморожуванні і зберігати твердий аморфний стан при висушуванні, тому вони найбільш ефективні для збереження біологічних матеріалів у висушеному стані [64].

Головною умовою протоколу висушування бактеріальних клітин вважається виключення відтавання замороженого матеріалу. Конструкція та технологія ліофільної сушарки дозволила нам забезпечити дотримання цього правила.

Культури консорціуму мають високу стійкість до впливу стресових технологічних факторів. Згідно з літературними даними виживаність ацидофільних молочнокислих культур становить 35-65% при використанні L глутамінової кислоти в якості протектора клітини.

Для ліофілізації ми також спробували використати заморожені клітинні гранули і отримати з них висушений кінцевий продукт. Заморожені палети ми перенесли на лотки, які розміщуються на полицях. Полиці мають можливість регулювання температури і поступово нагріваються після створення вакууму в камері сублімаційної сушки. Класичний варіант полягає в заповненні лотків кріозахищеним концентратом. Підноси після цього були розміщені зверху на полиці з регульованою температурою, які спочатку охолодили до температури замерзання при атмосферному тиску. Як тільки

концентрат в кожному лотку замерз, полиці поступово нагрівалися після дії вакууму. Застосовуваний вакуум коливався від 100 до 1000 мТорр, а температура полиць - від -40 до + 40 °C. Тривалість сушіння виморожуванням варіюється в залежності від штаму, його складу і циклу сушіння, але зазвичай для його завершення потрібно кілька днів. Перевага сублімаційного сушіння полягає в тому, що цей процес підтримує пробіотичні клітини при низькій температурі, щоб обмежити пошкодження їх структури і метаболітів.

Після видалення з сушарки ліофілізований матеріал було подрібнено в порошок з контролем розміром частинок і щільності. Подрібнений матеріал згодом можна застосовувати для змішування з наповнювачами, додатковими функціональними інгредієнтами, якщо це необхідно, і допоміжними засобами, в залежності від потреб клієнта. Після цього суміш можливо використати для виготовлення готових форм продукту, таких як капсули, саше або таблетки. Контроль якості проводився на зразках в процесі і на кінцевому продукті, щоб переконатися, що кінцевий продукт має високу якість і не містить забруднень.

Таким чином, можна зробити висновок, що ліофільна сушка є більш перспективним методом, оскільки консервовані культури та штами здатні зберігатись значно довше, ніж заморожені. Також ми відзначили, що ліофілізовані препарати потребують менше наповнювачів у кінцевому продукті, що забезпечує їх компактність.

2.2.4 Розробка поліштамових пробіотичних препаратів

В процесі дослідження поліштамові пробіотики ми конструювали, спираючись на властивості бактеріальних штамів, на їх вплив на організм господаря, їх сумісність за умовами існування та біохімічної активності, а також залежно від товарної форми препарату та напрямку його використання. Внаслідок комплексного аналізу мети створення, виникла

необхідність розрахунку правильних співвідношень культур у комплексному препараті та виведення оптимальних умов для їх дії.

Щоб виробляти пробіотики і молочні закваски з високими експлуатаційними характеристиками, унікальні вимоги до живлення і чутливість кожного штаму до різних аспектів процесу культивування повинні бути добре зрозумілі і враховані в процесі виробництва. Ці залежності були виявлені в ході лабораторних експериментів, масштабовані в пілотному режимі і індустріальному тесті, перш ніж процес був завершений і почалося комерційне виробництво.

Разом з тим, розробка індивідуального виробничого процесу для обліку цих штамоспецифічних залежностей створило додаткові проблеми через складність, пов'язану з пошуком сировини і його керуванням, а також з керуванням іншими численними процесами на виробничому об'єкті.

На підприємстві ПрАТ «Лакталіс – Миколаїв» діє автоматична система керування виробництвом, що заснована на системах установок, танків і ліній. Також обладнана лабораторія та пілотна установка полегшують дослідження і подальше виробництво. Контроль температур, pH середовища та режим роботи обладнання керується як в автоматичному режимі, так і під наглядом операторів.

Складності стосовно штамів, пов'язаних з мезофільними (наприклад, *Lactococcus lactis*) і термофільними (наприклад, *Streptococcus thermophilus*) молочними заквасками, менш виражені, і з цими мікроорганізмами допускаються більш загальні умови ферментацій і виробничих процесів..

Окрім спільного культивування ми складали композиції пробіотиків із висушених препаратів в кінці процесу. Але цей спосіб містить певні складності, оскільки для різних препаратів є різний поріг виживаності мікроорганізмів. Можна свідчити, що це є причиною того, що цей процес потребує більш часозатратних і точних розрахунків і знаходиться на межі комерційного ризику.

3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

Останнім часом все більше і більше харчових компаній приймають перспективне рішення зосередити своє виробництво на продуктах з пробіотичними властивостями, які можуть надати цінну підтримку здоров'я і благополуччя населення.

Застосування пробіотика в харчовій промисловості має дві конкретні переваги: потенційне зниження витрат на антибіотики та консерванти завдяки спеціальному профілактичному ефекту псування за рахунок антагоністичних властивостей, і поширення лікувальних властивостей від кишкових, серцево-судинних і травних захворювань, а також зміцненню системи імунітету, що позитивно відображається на попиті з боку споживача.

Технологію виробництва пробіотичних продуктів на виробництві можна реалізовувати двома способами - термостатним і резервуарним.

Використовуючи термостатний спосіб виготовлення пробіотичного продукту, отриману активовану рідку закваску вносять в 1000 літрів молочної суміші і потім ретельно перемішують. Після цього рідину розливають в тару і витримують в термостаті протягом 24 годин за температури, яка відповідає потребам поліштамового пробіотика. Процес можливо масштабувати і на більшу кількість середовища, але великі партії продукту важче виділяти.

Застосовуючи резервуарний спосіб, первинні етапи, такі як активація культури та утворення маточної культури можуть бути замінені внесенням замороженої закваски безпосередньо у резервуар, що спрощує процес заквашування. За цією технологією працює компанія Лакталіс для виробництва кисломолочних продуктів. Після чого суміш сквашують в резервуарі (а не термостаті) протягом 8 - 14 годин залежно від продукту за необхідної температури. Для термофільних організмів вона становить 38 – 42^{o}C, а для мезофільних – 24 – 30^{o}C. Після цього готовий продукт фасують в

тару, або використовують його для приготування більш складних молочних продуктів. При виготовленні кисломолочних продуктів на основі заквасок, що включають пробіотичні штами використовувалися об’єми пастеризованих молочних сумішей від 3 до 13 тон.

Вдала композиція пробіотичних заквасок склалася з 3 бактеріальних штамів: *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R і *Lactobacillus rhamnosus* CLR2. Препарат показав високу пробіотичну активність та незначну шкідливу дію на супутні заквасочні культури у випадку, коли використовувався для додавання в кисломолочні напої.

В результаті дослідження цей пробіотик став доступний у двох фізичних формах препарату: у вигляді ліофілізованого порошку в капсулах з ентеросолюбільним покриттям або у вигляді ферментованих напоїв.

Склад і співвідношення штамів не змінювалися з ранніх стадій розвитку вихідного ферментованого молока. Важливо відзначити, що навіть якщо *L. rhamnosus* CLR2 не був сертифікований до 2014 року, цей штам завжди використовувався у всіх пробіотичних продуктах. Пробіотики, які виготовляються компанією DANISCO сумісно з компанією Lactalis можуть продаватися в як фармацевтичних дозованих формах (наприклад, таблетки, капсули або порошок), так і в якості натуральних продуктів харчування (наприклад, ферментоване молоко, йогурт, сир).

L. rhamnosus CLR2 досліджувався і як окремий штам, так і в сумісності з іншими пробіотиками (в тому числі, з поліштамовими). Завдяки кільком дослідженнь на людях цей штам продемонстрував користь як для дітей, так і для дорослих [72].

З історією успішних наукових досліджень, німецький штам *Bifidobacterium*, UABla-12 продовжує залишатися популярним штамом у різних галузях виробництва. Він був частиною унікального паралельного дослідження, розробленого для оцінки впливу конкретних штамів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* на здоров'я шлунково-кишкового тракту.

Позитивний результат дослідження доповнює вже досить обширний список функцій підтримки травлення і імунітету [74].

Слід окремо зазначити, що у дослідженні було доведено, що як окремий штам, штам UABla-12 ™ може сприяти загальному зміцненню здоров'я і підвищенню комфорту травної системи, стабілізації роботи кішківника, потенційному зменшенню епізодичного здуття живота. Загалом як окремий штам, UABla-12 потенційно допомагає поліпшити якість життя, на яке впливає здоров'я травної системи [75].

При поєднанні з *Lactobacillus acidophilus*, DDS, у відповідній кількості, в дослідженнях було з'ясовано, що суміш допомагає забезпечити підтримку здоров'я шкіри, підтримати імунне здоров'я і здоров'я дихальних шляхів, сприяє оптимальному здоров'ю дітей 2-3 років [75].

У суміші з чотирьох штамів штам UABla-12 ™ зіграв важливу роль в двох дослідженнях, які доводять, що в такій комбінації він суттєво підтримує здоров'я травної системи, допомагає підтримувати нормальні звички кишківника, здійснює значний вплив на регулярність і комфорт діяльності кишківника.

Аналіз останніх досліджень на теми виробництва пробіотиків, їхнього впливу на здоров'я людини та економічного значення у харчовій галузі, окремим фактором виділяється застосування пробіотичних препаратів у ветеринарній медицині.

Як свідчить світовий досвід, на практиці пробіотики застосовують в раціональному годівлі тварин: в скотарстві – для корекції мікрофлори, підвищення живої маси; в свинарстві – для стимуляції росту і розвитку поросят, життєздатності, профілактики шлунково-кишкових хвороб, зокрема, діареї поросят і стресу зміни місцеперебування; в птахівництві – для посилення природної резистентності, корекції кишкового мікробіоценозу, профілактики діареї і стресу, активізації зростання м'язової тканини [74].

Для розробки нової пробіотичної добавки були обрані, виділені і ідентифіковані три штами лактобацил: *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus intermedius* і *Lactobacillus salivarius* [76].

В результаті проведених експериментів, було підтверджено ефективність обраних штамів лактобацил. Наступним кроком стала розробка і впровадження технологічного процесу виробництва вищезгаданого пробіотика, який включає в себе декілька етапів:

- отримання чистих культур штамів бактерій і забезпечення їхнього зберігання;
- розмноження чистих культур в лабораторних умовах;
- приготування маточної культури (активної рідини-закваски) в трилітрових ємностях;
- культивування штамів в ферментері;
- розфасовка препарату по індивідуальним упаковкам;.

Для оптимального стану обраних лактобацил (*Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus intermedius* і *Lactobacillus salivarius*) при їх спільному культивуванні в ферментері, було підібрано найбільш економічно доступне виробниче живильне середовище, яке показало найкращі результати експерименту - мелясо-амонійне середовище. Був підібраний найбільш оптимальний склад, який включав: амонію хлориду - 0,9 г/л; меляси бурякової - 15,0 г/л; кукурудзяного екстракту - 10,0 мл/л; сухої молочної сироватки - 50,0 г/л. Дане живильне середовище готували на водопровідній воді при температурі 25 °С, поступово додаючи до суміші необхідні компоненти; pH розчину довели до 7,0-7,2, використовуючи 25%-й водний розчин аміаку.

Стерилізацію живильного середовища проводилось у такому порядку: нагрівання до температури 121 °С і витримка рідини протягом 20 хв. (видалення повітря з ферментера), наступні 30 хв. (витримуючи 1,0 атм.) стерилізувались усі технічні відводи. Після цього почалось охолодження

живильного середовища до 37 °С з підтримкою надлишкового тиску в порожнині ферментера 0,04±0,01 МПа і стабілізація pH середовища на рівні 7,0. Інокуляція маткових культур в ферментер здійснювалась шляхом асептичної передачі за допомогою перистальтичного насосу, вносячи 3-5% маткової закваски від обсягу середовища. У момент передачі в порожнині ферментера підтримувався надлишковий тиск на рівні 0,01-0,02 МПа.

На основі наукових даних компанії, нами було розроблено технологічну схему (рис. 2) виробництва поліштамної пробіотичної добавки. Ретельне дослідження властивостей обраних лактобактерій дозволило підтвердити їхній високий пробіотичний потенціал. Цим мікроорганізмам притаманні високий рівень кислотоутворення, здатність до утилізації вуглеводів, позитивні показники адгезивной і антиадгезивної активності, резистентність до кислоти і жовчі, стійкість до дії терапевтичних доз антибіотиків, а також безпечність для застосування.

Пробіотики мають насичену історію очевидного безпечного використання, особливо у здорових людей. Однак лише в декількох дослідженнях детально вивчалася безпечність вживання культивованих пробіотиків, тому достовірної інформації про частоту і серйозність побічних ефектів недостатньо.

Якісна культивація пробіотиків – складний виробничий процес, який забезпечує як високий вихід, так і стабільність. Цей процес повинен відповідати певним вимогам, одна з яких – відсутність алергенів, що виключає деякі очевидні інгредієнти живильного середовища. Відтворюваність важлива для забезпечення стабільно високої продуктивності виробництва. Для цього необхідний контроль якості протягом усього процесу виготовлення препарату, від сировини до кінцевого продукту, а також дотримання відповідних документацій та інструкцій з контролю якості. Виготовлення специфічних споживчих продуктів вимагає професійних навичок і досвіду.

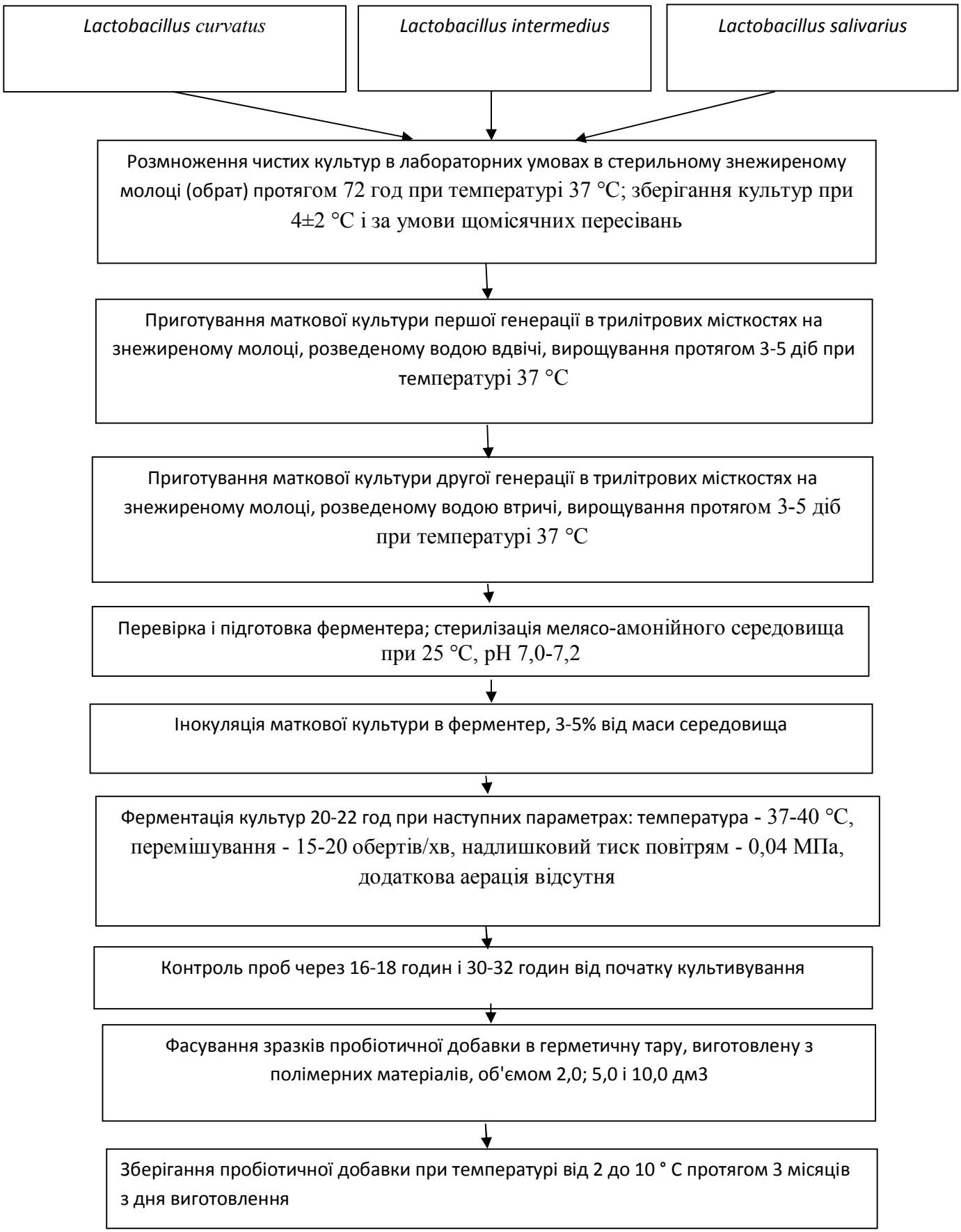

Рис. 2. **Технологічна схема виробництва експериментальної поліштамової пробіотичної добавки**

Управління виробничим процесом відбувається на декількох рівнях, включаючи наступні:

1. Постачальники сировини проходять аудит. Якість поставленої сировини оцінюється на певному рівні для забезпечення високої якості.

2. Встановлення аргументованих діапазонів для параметрів процесу і перевірка його на предмет постійного знаходження в цих діапазонах.

3. Максимально можлива автоматизація виробництва з метою зменшення неузгодженостей, пов'язаних з людським фактором і аспектами виробничого процесу, які контролюються працівниками вручну.

4. Забезпечення належного професійного навчання операторів і низької плинності кадрів.

5. Оцінка зібраних даних процесу і використання підходів «Шість сигм» для постійного поліпшення і забезпечення максимально послідовного відтворення процесу. Оцінка зразків в процесі і кінцевого продукту з метою підтвердження того, що продукт відповідає високим характеристикам і не містить забруднюючих речовин [78].

Як було вказано раніше, сировину для виробництва пробіотиків і молочних заквасок необхідно ретельно відбирати і контролювати. Однак, крім вимог до технології виробництва, можлива наявність і вимог з боку споживача. Вони можуть як відноситися до кошерних і халяльних категорій (традиційно-моральні вимоги покупців), так і стосуватися відсутності певних алергенів в кінцевому продукті (фізіологічні потреби). Цей момент може значно ускладнити завдання виробника, оскільки деякі зі зазвичай використовуваних середовищ для культивування мікроорганізмів не будуть відповідати цим вимогам. Для питання кошерності це означає кошерні інгредієнти, відсутність змішування молочних і м'ясних продуктів, використання кошерних методів. Що стосується алергенів, при виробництві слід уникати найбільш поширених харчових алергенів, таких як молочні продукти, соя, глютен і горіхи. Для вегетаріанської і веганской продукції, слід

уникати м'ясних і молочних продуктів відповідно. Що стосується харчових добавок, то відсутність екстрактів молочних продуктів, сої та м'яса вимагає пошуку альтернативних джерел азоту. Слід уникати джерел вуглецю, отриманих з пшениці, через потенційного забруднення глютеном. Також необхідно виключити можливість використання джерел вуглецю, отриманих з пшениці, через потенційного забруднення глютеном. Не менш важливим моментом є обовязкова задокументованність такої продукції, що гарантує відсутність алергенів або підтверджує належність товару до категорії кошерних, халяльних, вегетаріанських та / або веганських продуктів [81].

Дотримання нормативних вимог і стандартів призводить до зміцнення контролю якості і покращення результатів виробництва. Аудиторні перевірки впливають на здатність виробничих об'єктів контролювати якість для випуску більш узгодженого кінцевого продукту.

Завдяки застосовуванню належної лабораторної практики (GLP), лабораторія контролю якості зводить до мінімуму перехресне забруднення, перевіряючи усі етапи виробництва кінцевого продукту. Це включає в себе особисту гігієну, належні засоби індивідуального захисту (ЗІЗ), встановлення протоколів пішохідного руху, потік продукції через лабораторію, а також процедури санітарії та журнали. Аналіз небезпек і критичні контрольні точки (HACCP) використовується для визначення критичних контрольних точок і встановлення прийнятних протоколів для мінімізації небезпек, особливо на підприємстві ПрАТ «Лакталіс-Миколаїв» та подібних йому. Використання клієнтського, а також внутрішнього аудиту лабораторії контролю якості дозволяє виявити області, що викликають постійну заклопотаність, і переконатися, що процедури дотримуються.

Метрологія так само важлива, як GLP, в створенні надійної програми атестації і калібрування лабораторного обладнання. Таке професійне обладнання, як автоклави, інкубатори, середовища чистих кімнат, піпетки і т. ін., потребує особливого контролю і обслуговування як кваліфікованими

зовнішніми представниками, так і лаборантами підприємства. Додатковий моніторинг обробки повітря і якості води є важливим для запобігання специфічного забруднення. Також важливу роль відіграє діяльність технологічної служби, яка здійснює контроль справності промислового обладнання та систем автоматичного керування.

Професійні навички лаборантів регулярно контролюють шляхом розробки спеціальних аудиторських програм, за допомогою якої точність тестів якості може бути перевірена за допомогою відомих засобів і методів контролю. Діяльність кваліфікованих лаборантів і підвищення їх професійних навичок допоможе звести до мінімуму неузгодженість результатів на підприємстві.

Разом з тим, розроблено план відбору проб, який включає перевірку сировини, пакувальних матеріалів, напівфабрикатів, проміжних і кінцевих продуктів, а також чистоту обладнання.

Проаналізувавши основні питання щодо ефективності виробничого процесу, необхідно звернути увагу і на сам продукт. Спостерігаючи тенденцію того, що все більше і більше людей починають вживати пробіотичні препарати, необхідно проводити нові дослідження, що доводять ефективність та безпечність нових продуктів на ринку пробіотиків.

Наприклад, в ході такого дослідження було доведено деякі побічні ефекти, що спостерігаються при використанні пробіотичних лактобацил і відповідних видів. Описані три випадки сепсису *L. casei*.

У систематичному огляді літератури експертами групи Lactalis було виявлено десять випадків інфекційного ендокардиту, викликаного *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* і *Lactobacillus*.

4. БЕЗПЕКА ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ

Відповідність умов на підприємстві нормативним вимогам зумовлює безпечні та комфортні умови праці для працівників підприємства. Безпечні умови праці на виробництві можуть бути забезпечені тільки при строгому дотриманні норм безпеки, промислової санітарії пожежної безпеки. На сьогодні забезпечення вдалого використання технологічного обладнання, виконання безпечних умов праці залишаються актуальними.

Для досягнення позитивних показників в лабораторії, яка спеціалізується на поліштамових пробіотиках певну увагу приділяють безпеці життєдіяльності у напрямках діяльності. Для прискорення соціально економічного розвитку лабораторії потрібно розглянути поліпшення стану в безпеці життєдіяльності в умовах виробництва.

Серед небезпечних і шкідливих виробничих чинників виділяють такі:

Підвищений рівень ультрафіолетової радіації. Джерелом цього випромінювання на виробництві є бактерицидні кварцеві лампи для забезпечують стерильність лабораторних боксів. У нормальних умовах опромінення допускається впродовж 20 хвилин з інтенсивністю 0,005 Вт/м2.

*Підвищений рівень електромагнітних випромінювань***.** Джерелом цих випромінювань є ПК та периферійні електричні пристрої. Лабораторні комп'ютери використовуються для збирання, обробки, аналізу наукових інформаційних даних, які були одержані в результаті експериментів з мікроорганізмами. Якщо працівник здійснює свою діяльність впродовж більш ніж 3 годин у радіусі дії електромагнітного поля з рівнем випромінювань, який перевищує гігієнічну норму, це може призвести до функціональних порушень життєво-важливих систем – ендокринної, серцево-судинної, нервової.

*Підвищений рівень шуму***.** Він виникає на робочому місці внаслідок діяльності вентиляційної системи, стерилізаційного обладнання, насосів,

електродвигунів або іншої техніки. Шум з рівнем більше 50 дБА негативно відображається як на концентрації і зосередженості працівника, так і на його органах слуху та центральній нервовій системі.

*Шкідливий вплив хімічних речовин***.** Перш за все, небезпека дії хімічних речовин пов'язана з тим, що під час проведення досліджень і експериментів в лабораторних умовах спостерігається безпосередній контакт працівника з різноманітними реактивами, які можуть мати токсичну чи канцерогенну дію, а також спричинити опіки шкіри, дихальних шляхів та слизових оболонок. Велика кількість цих речовин характеризується токсичною (гідроксиди калію та натрію, аміак, багато видів кислот і розчинників, етиловий спирт, солі калію та магнію, біхромати, неорганічні сполуки фосфору, ароматичні вуглеводні тощо), подразнюючою (дезінфікуючі та мийні засоби, хлор, фтор і азотомісткі сполуки, вапняк), канцерогенною (ароматичні вуглеводні, біхромати), алергенною (антибіотики, вапняк, біхромати) діями. Часто вищезгадані хімічні речовини діють у повітрі протягом багатьох годин у таких концентраціях, які перевищують або дорівнюють гранично допустимим нормам.

Саме для зменшення впливу вищезгаданих шкідливих і небезпечних факторів виробництва в лабораторіях розроблено систему технічних та організаційних заходів.

Для профілактики перенапруги очей працівника керівництву слід забезпечити дотримання режимів праці та відпочинку, безпечного розміщення ПК і периферійних пристроїв, модернізацію цього обладнання, моніторів, гарантувати раціональне освітлення робочого місця. Окрім того, працівник повинен слідувати правилам техніки безпеки, в тому числі вимикати пристрої, які на даний час не використовуються (особливо радіоелектронні), регулярно перевіряти їхню справність і в разі виявлення дефектів – попереджувати службу технічного обслуговування.

Експлуатація бактерицидних ламп повинна відбуватися згідно з вимогами, які зазначені в технічному паспорті пристрою та в інструкції з його експлуатації. Застарілі бактерицидні лампи необхідно вчасно замінювати новими згідно з терміном експлуатації. До роботи з бактерицидними установками керівник повинен допускати лише тих працівників, які пройшли необхідний інструктаж з охорони праці.

Знезараження повітряного середовища за допомогою бактерицидних ламп здійснюється тільки за умови відсутності людей у спеціально відведений для цього час.

Окрім технічних аспектів безпеки праці, не менш важливими є лікарсько-профілактичні заходи. До них належать систематичні проходження медичних оглядів персоналу лабораторії, обмеження в часі перебування людей в зоні підвищеної інтенсивності шкідливих випромінювань.

Одним з сучаних методів захисту від надмірного ультрафіолетового випромінювання є застосування захисних екранів. Вони бувають двох типів: хімічні, які являють собою речовини, що здатні поглинати випромінювання, і фізичні, які поглинають або розсіюють випромінення. Спеціальне скло, яке використовується у захисних окулярах, має відповідати міжнародним стандартам.

Абсолютний захист від ультрафіолетового випромінювання в наш час може бути забезпечений спеціальним склом товщиною 2 мм, яке містить у складі оксид свинцю, і носить назву «флінтглас». Окрім того, зниження інтенсивності ультрафіолетового випромінювання можливо досягти завдяки фарбуванню робочих приміщень спеціальними фарбами і безпечному розміщенню безпосередньо робочого місця стосовно джерела променів. Деякі фахівці з охорони праці пропонують розміщення окремих вимикачів зовні лабораторії, які здійснюють подачу або відключення електричного живлення бактерицидних установок у ній.

ДСН 3.3.6.037–99 передбачає граничний рівень шуму для роботи на підприємстві. Фанеровані звукопоглинальні матеріали для оздоблення стін та стелі дозволяють знизити рівень шуму на виробництві. Разом з тим, зменшення шумового навантаження на працівників можна досягти завдяки акустичній оптимізації вентиляційної системи, використання додаткових перегородок у приміщеннях і користування обладнанням, яке виділяє мінімальний рівень шуму. Також можливе застосування шумозахисних навушників чи беруш.

Для захисту від шкідливої дії хімічних речовин при роботі необхідно дотримуватися правил охорони праці та техніки безпеки. Додатковий і обов'язковий профілактичний захід для осіб, які працюють з хімічними речовинами, - це засоби індивідуального захисту. Спецодяг, спецвзуття та індивідуальні засоби захисту повинні повністю захищати працівника від шкідливої дії токсичних речовин.

При роботі з сипучими речовинами, працівник повинен використовувати засоби захисту дихальних шляхів та очей (маски, респіратори, окуляри).

З метою уникання або в мінімізації шкідливого впливу хімічних речовин на організм людини, лаборанту необхідно чітко дотримуватись наступних заходів з охорони праці:

1. Відповідльній особі обов'язково слід проводити інструктаж з техніки безпеки на робочому місці перед початком виконання робіт, а за умови проведення діяльності з підвищеним рівнем небезпеки - оформити відповідний наряд-допуск.

2. Забезпечити систематичний нагляд за роботою вентиляційних систем.

3. Усі лабораторні роботи необхідно проводити тільки в спеціальному одязі та спеціальному взутті з обов'язковим використанням засобів індивідуального захисту (рукавичок, окулярів, фартуків).

4. Усі робочі місця повинні бути забезпечені достатньою кількістю води і нейтралізуючих речовин.

Лабораторія і усі процеси виробництва обов'язково мають бути забезпечені автоматичною пожежною сигналізацією і швидко доступними вогнегасниками. Бокси з термостатами і шафами для стерилізації та сушки також повинні бути забезпечені вогнегасником та азбестовою або вовняною ковдрою. Забороняється розміщувати вибухонебезпечні, легкозаймисті, горючі, токсичні та агресивні речовини на сушильно-стерилізаційних шафах і термостатах.

Працівники зони промислового виробництва повинні дотримуватися правила техніки безпеки поводження у цеху з виробництва пробіотиків. Вони обов'язково мають бути вдягнені у санітарний одяг та взуття з неслизькою підошвою. Категорично забороняється бігати по цеху. При роботі та контакті з миючими засобами необхідно вдягати засоби індивідуального захисту (окуляри, респіратори, гумові рукавиці). Кожен працівник має пройти інструктаж, який включатиме не лише правила техніки безпеки, а і принципову схему виробництва із демонстрацією систем пари та миючих ліній для уникнення контакту з гарячими поверхнями та шкідливими речовинами. Небезпечне обладнання та зони виробництва повинні обов'язково бути позначені спеціалізованими знаками із схематичним зображенням характеру небезпеки (наприклад, знаки хімічної небезпеки).

Разом з усім вищезгаданим, у лабораторії контролю якості пробіотиків і в усіх цехах виробництва повинні бути в наявності інструкції з пожежної безпеки, з обслуговування установок пожежогасіння, з обслуговування установок пожежної сигналізації, оперативні картки дій на випадок виникнення пожежі, схема евакуації людей на випадок пожежі, встановлена система оповіщення людей про пожежу, плани та графіки проведення протипожежних тренувань, навчання і перевірки знань персоналу, технічного нагляду за системами пожежного захисту, порядок проведення планово-

попереджувальних ремонтів та оглядів електроустановок, опалювального, вентиляційного, технологічного та іншого інженерного обладнання тощо.

ВИСНОВКИ

1. Роль пробіотиків для здоров’я організму людини важко переоцінити. Досліджуючи це питання, ми ознайомилися зі значною кількістю наукових робіт, найдавніші з яких досягають більш ніж тисячного віку. Найбільш відомі з них (наприклад, роботи І.І.Мечникова, Луї Лемері, А. Ніcль, Б.А.Шендерова, Р.Фуллера, Томотарі Міцуока, Дж.Р. Гібсона, М.Б. Робертройда) довзолили нам ретельно розглянути усі аспекти розвитку і функціонування пробіотиків в процесі їхньої еволюції.
2. Нині можливо спостерігати, що більшість досліджень пробіотиків зосереджується на визначенні впливу окремих штамів. Разом з тим, були розглянуті і результати досліджень, в яких вивчалися ефекти добавок, що містять декілька штамів (поліштамові або мультиштамові пробіотичні добавки).
3. Було виявлено, що серед мікроорганізмів найскладнішим для виділення є вид *L. Acidophilus* та знайдено шляхи його спрощеного виділення. Іншим важливим досвідом було спостереження того, що *Propionibacterium freudenreichii ssp. Shermanii* ростуть тільки на агарі MRS і ВА-галактозному агарі. Інші організми, такі як *L. casei*, *L. rhamnosus* і *L. acidophilus* росли на всіх середовищах на основі цукру. Доведено, що базальний агар, БА-сорбітольний агар та БА-манітольний агар в аеробній інкубації при 43 °С та вони ж при 43 °С та анаеробній інкубації підтримують ріст лише *L. rhamnosus*.
4. Існує вплив того чи іншого середовища на розвиток певного виду, штаму, або групи штамів бактерій, що доведено завдяки якісній оцінці біооб’єктів на основі моделей ферментації цукру.
5. Експеримент надав можливість створювати нові поліштамові препарати пробіотиків, складаючи композиції корисних мікроорганізмів.

6. Найбільш перспективною і ефективнішою є ліофільна сушка, оскільки консервовані культури та штами показали здатність зберігатися значно довше, ніж заморожені. Разом з тим треба відзначити, що ліофілізовані препарати потребують менше наповнювачів у кінцевому продукті, що забезпечує їхню вищу компактність. Проте, кріоконсервовані пробіотичні закваски без додаткових ускладнень можна використовувати у масштабному виробництві, в тому числи при переробці молока, що пов'язано з простішим способом внесення продуцента у середовище та оминанням процедури створення маточної культури. А тому підприємство ПрАТ «Лакталіс-Миколаїв» використовує заморожені закваски для заквашування молочних сумішей.

7. При створенні поліштамових пробіотиків виникає необхідність розрахунку коректних співвідношень культур у комплексному препараті та виведення оптимальних умов для їх дії, а також велика кількість лабораторних та клінічних випробувань, потреба відповідності стандартам якості. Додаткові проблеми виникають в зв'язку з пошуком сировини і управлінням процесами виробництва пробіотика. Альтернативою може бути метод складання композиції пробіотиків із висушених препаратів в кінці процесу, але і цей спосіб містить певні складності, оскільки для певних препаратів є різний поріг виживаності мікроорганізмів.

8. Доцільно розвивати даний напрямок досліджень, оновлюючи та покращуючи обладнання на молокопереробних підприємствах та спеціалізованих заводах з виробництва заквасок та пробіотиків. Також необхідно надавати кваліфіковану підготовку спеціалістам у даній галузі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Rout George Kerrya, Jayanta Kumar Patrab, Sushanto Gouda, Yooheon Parkb Han-Seung Shin, Gitishree Das. Benefaction of probiotics for human health: A review / Rout George Kerrya, Jayanta Kumar Patrab, Sushanto Gouda, Yooheon Parkb Han-Seung Shin, Gitishree Das. // Journal of Food and Drug Analysis Volume 026,. – С. 927–939.
2. J. Lloyd-Price, G. Abu-Ali, C. Huttenhower//The healthy human microbiome - Genome Med, 8/ - 2016. - 1-11
3. Probiotics and ancient history [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://laktera.bg/en/probiotics-and-ancient-history/.
4. Геродот. История в девяти книгах. Изд-во «Наука», Ленинград, 1972. Перевод и примечания Г. А. Стратановского, под общей редакцией С. Л. Утченко. Редактор перевода Н. А. Мещерский
5. *Гален, Клавдий*. О назначении частей человеческого тела / Пер. С. П. Кондратьева, под ред. и с примеч. В. Н. Терновского, вступ. ст. В. Н. Терновского и Б. Д. Петрова. М.: Медицина. 1971. 555 стр. 5000 экз.
6. *Гален*. Ars medica. Медицинское искусство (I—XVIII) / Пер., прим. и вступ. ст. И. В. Пролыгиной // Интеллектуальные традиции в прошлом и настоящем. Вып. 2. М.: Аквилон, 2014. С. 95-129.
7. *Гален*. Ars medica. Медицинское искусство (XIX-XXXVII) / Пер., прим. и вступ. ст. И. В. Пролыгиной // Интеллектуальные традиции в прошлом и настоящем. Вып. 3. М.: Аквилон, 2016. С. 102—153.
8. *Jole Shackelford.* A Philosophical Path for Paracelsian Medicine: The Ideas, Intellectual Context, and Influence of Petrus Severinus (1540—1602). — Copenhagen: Museum Tusculanum Press, 2004. — Pp. 519.
9. *Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheimю. Die große Wundarzney*. Ульм, Hans Varnier, 1536; Аугсбург, Haynrich Stayner

(Steyner), 1536; Франкфурт-на-Майне, Georg Raben и Weygand Hanen, 1536.

10. Гельмонт // Энциклопедический словарь Брокгауза и Ефрона : в 86 т. (82 т. и 4 доп.). — СПб., 1890—1907.
11. *Harré, Rom.* Great Scientific Experiments (англ.). — Oxford: Oxford University Press, 1983. — P. 33 — 35.
12. The Origins of Probiotic Theory [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://tablematters.com/the-origins-of-probiotic-theory/.
13. Richard S. Westfall (Indiana University), Sylvius, Franciscus dele Bo // Galileo Project, RICE University, 1995
14. FRANCISCUS DELE BOE, SYLVIUS 1614—1672 — Biografieën uit A History of Science in the Netherlands (Brill) — Digitaal Wetenschapshistorisch Centrum (DWC) — KNAW: «Franciscus dele Boë», page 577—579.
15. Franciscus Sylvius. Praxeos medicae idea nova / Franciscus Sylvius., 1671.
16. Thomas Willis - British physician [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.britannica.com/biography/Thomas-Willis.
17. Willis, Thomas, , author. Pharmaceutice rationalis, sive, Diatriba de medicamentorum operationibus in humano corpore / Willis, Thomas, , author. – prostant apud. Ric. Davis,: Oxoniae : E Theatro Sheldoniano, 1678.
18. Willis, Thomas. Aesculapius instructs Hygeia in the art of medical illustration / Willis, Thomas. – prostant apud. Ric. Davis,: Amstelaedami: Henricum Wetstenium, 1682.
19. RARE EDITION ORIGINALE COLLATION : Un volume in-12 (159x95 mm), (46)-541-(3) pages LEMERY. Traité des Aliments, o. 1702 LEMERY, Louis
20. Dissertation sur la nourriture des os : ou l'on explique la nature & l'usage de la moelle . Avec trois lettres sur le livre de generation des vers dans le corps de

l'homme. Par Me Louis Lémery,... Date de l'édition originale : 1704

21. Traité des alimens de caresme de Nicolas Andry de Boisregard [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://bibulyon.hypotheses.org/12528.
22. Philippe Hecquet. Traité des dispenses du carême / Philippe Hecquet. – 1710: de deux dissertations, l'une sur les macreuses et l'autre sur le tabac. augmentée par l'auteur. – (2de édition).
23. The vanities of philosophy, and physick (London : W. Turner, 1700)
24. *Chambers, Ephraim (1728). Cyclopædia: or, An Universal Dictionary of Arts and Sciences (1 ed.). London: James & John Knapton; John Darby; and others.*
25. Escherich, Theodor [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/escherich-theodor.
26. Grigoroff, Stamen, 1905. Étude sur une lait fermentée comestible. Le «Kissélo mléko» de Bulgarie. Revue Médicale de la Suisse Romande. Genève. Georg&G., Libraires-Éditeurs. Librairie de L'Université.
27. Современное состояние вопроса о старческой атрофии / [Соч.] Ил. Мечникова. — Санкт-Петербург: К. Л. Риккер, 1899. — 16 с.
28. О діэтическомъ значеніи «кислаго молока» проф. Мечникова. Клиническія наблюденія изъ СПБ. Морского Госпиталя, доктора мед. Г. А. Макарова. С.-Петербургъ. Изданіе К. Л. Риккера. Невскій пр., 14. 1907
29. Escherichia coli Nissle 1917. // The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology / , 2017. – С. 59–69.
30. Функциональное питание и пробиотики: микроэкологические аспекты / Б. А. Шендеров, М. А. Манвелова. - [2-е изд., перераб.]. - М. : Агар, 1997. - 23,[1] с.; 21 см. - (В помощь практикующему врачу).; ISBN 5-89218-028-3 : Б. ц.

31. HISTOIRE DES PROBIOTIQUES [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://lallemand-health-solutions.com/fr/notre-recherche/probiotic-history/.
32. Tomotari Mitsuoka. Prebiotics and Intestinal Flora / Tomotari Mitsuoka., 2002. – (Bioscience and Microflora 21(1):3-12).
33. Parker, R. B. (1974)."Probiotics, the other half of the antibiotic story". Animal Nutrition and Health.
34. Riise T. Early prognostic factors for disability in multiple sclerosis, a European multicenter study / T. Riise, M. Gronning, O. Fernandez et al. // Acta Neurol. Scand.- 1992.-Vol.85, N3.-P.212-218.
35. R. FULLER AFRC Institute of Food Research, Reading Laboratory, Shinjeld, Reading RG2 9AT. UK Received I - January 1989. - Journal of Applied Bacteriology 1989, 66, 365-378
36. САФОНОВ Георгий Анатольевич [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://www.cnshb.ru/AKDiL/akad/base/RS/000178.shtm.
37. Havenaar R, Huis In't Veld MJH. Probiotics: a general view. In: Lactic acid bacteria in health and disease. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 1992.
38. Salminen S. Uniqueness of probiotic strains. IDF Nutr News Lett 1996;5:16–8.
39. Schaafsma G. State of art concerning probiotic strains in milk products. IDF Nutr News Lett 1996;5:23–4
40. Jürgen Schrezenmeir and Michael de Vrese. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition1 / Jürgen Schrezenmeir and Michael de Vrese. // Am J Clin Nutr 2001;73(suppl):361S–4S. Printed in USA. – 2001.
41. Gibson GR, Robertroid MB. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 125: 1401—1412.
42. Lyons, P. J. Appl. Bacteriol / P. Lyons, RJ. Fallon. 1992. - Vol. 66, № 3.- P. 22.

43. Калмыкова, А.И. Пробиотики: терапия и профилактика заболеваний. Укрепление здоровья / А.И. Калмыкова. — Новосибирск: «Био-Весга»; СибНИПТИП СО РАСХН, 2001. 208 с.
44. NIH Human Microbiome Project [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://hmpdacc.org/.
45. Orishak Elena Aleksandrovna (RU), Bojtsov Aleksej Gennad'evich (RU), Nilova Ljudmila Jur'evna (RU). Способ индивидуального подбора пробиотических препаратов, содержащих лактобактерии и/или бифидобактерии для элиминации условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от пациента при исследовании на дисбактериоз кишечника / Orishak Elena Aleksandrovna (RU), Bojtsov Aleksej Gennad'evich (RU), Nilova Ljudmila Jur'evna (RU). // ПАТЕНТ № RU2010122714/10A events. – 1009.
46. Валерий Александрович Несчисляев (RU)Людмила Клавдиевна Скудаева (RU) Ирина Васильевна Павленко (RU)Наталья Леонидовна Башкирцева (RU). Способ получения и контроля пробиотических препаратов// Application filed by Федеральное государственное унитарное предприятие "Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам "Микроген" Министерства здравоохранения Российской Федерации. // ПАТЕНТ № RU2332454C2 / – 2008.
47. А.В. Молокеев, Л.Г. Никулин, Р.М. Ильина, Э.В. Криницина, Т.Л. Карих, Н.В. Молокеева, В.И. Байбаков, М.А. Андреева, Н.В. Соболева. Препарат-пробиотик в сухой иммобилизованной форме / // Application filed by Дочернее государственное унитарное экспериментально-производственное предприятие "Вектор-Биальгам". / ПАТЕНТ № RU2164801C1 – 2001.

48. A probiotic, a food product containing a probiotic, a method for preparation of said food product, a pharmaceutical composition and a use of the probiotic strain. // EP1243180A1. – 2002. – C. European Patent Office.
49. PROBIOTIC ORAL HEALTH PROMOTING PRODUCT. // DATABASE WPI Week 20-02-19, Derwent World Patents Index; AN 2002-140573. – Patent # EP 1978979 B1
50. Malireddy S. ReddyDamavarapu Radha Krishna ReddyNaraparaju A. V. Prasad. Herbal and pharmaceutical drugs enhanced with probiotics / Malireddy S. ReddyDamavarapu Radha Krishna ReddyNaraparaju A. V. Prasad. // US6080401A. – 2000. – C. United States.
51. Осадчий А.І. Вплив пробіотиків на здоров'я людини: від народження до зрілості [Електронний ресурс] / Осадчий А.І. // Український медичний часопис. – 6. – Режим доступу до ресурсу: https://www.umj.com.ua/article/169232/vpliv-probiotikiv-na-zdorov-ya-lyudini-vid-narodzhennya-do-zrilosti.
52. Значення пробіотиків для здоров'я дитини [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://health-ua.com/article/45056-znachennya-probotikv-dlya-zdorovya-ditini.
53. Yiannis Kourkoutas *et al.* // Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. - *Journal of Nutrition and Metabolism*./- Volume – 2013.- 15 pages
54. K. Wickens, P. Black, T. V. Stanley et al., "A protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 against eczema in the first 2 years of life persists to age 4years," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 42, no. 7, pp. 1071–1079, 2012.
55. C. Daly and R. Davis, "The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health," *Agricultural and Food Science*, vol. 7, no. 2, pp. 219–250, 1998.

56. J. Heller, “Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, no. 2, pp. 374S–379S, 2001.
57. S. R. Yoo, Y. J. Kim, D. Y. Park et al., “Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-inducedobesity,” *Obesity*, 2013.
58. W. Krasaekoopt, B. Bhandari, and H. Deeth, “Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt,” *International Dairy Journal*, vol. 13, no. 1, pp. 3–13, 2003
59. U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko et al., “Comparison of different technologies for alginate beads production,” *Chemical Papers*, vol. 62, no. 4, pp. 364–374, 2008.
60. Capela, T. K. C. Hay, and N. P. Shah, “Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt,” *Food Research International*, vol. 39, no. 2, pp. 203–211, 2006
61. D. Charalampopoulos, S. S. Pandiella, and C. Webb, “Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, no. 5, pp. 851–859, 2002.
62. L. A. Bosnea, Y. Kourkoutas, N. Albantaki, C. Tzia, A. A. Koutinas, and M. Kanellaki, “Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat grains,” *Food Science and Technology*, vol. 42, no. 10, pp. 1696–1702, 2009.
63. F. Ortakci and S. Sert, “Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC, 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system,” *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no. 12, pp. 6918–6925, 2012.
64. *Грачева И.В., Осин А.В.* Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. -2016. - № 3. - С. 5-12.

65. Hansen, S.J.Z.; Tang, P.; Kiefer, A.; Galles, K.; Wong, C.; Morovic, W. Droplet Digital PCR Is an Improved Alternative Method for High-Quality Enumeration of Viable Probiotic Strains. *Front. Microbiol.* 2010, *10*.
66. Horvath, A.; Leber, B.; Schmerboeck, B.; Tawdrous, M.; Zettel, G.; Hartl, A.; Madl, T.; Stryeck, S.; Fuchs, D.; Lemesch, S.; et al. Randomised clinical trial: The effects of a multispecies probiotic vs. placebo on innate immune function, bacterial translocation and gut permeability in patients with cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016, *44*, 926–935.
67. Lukas Grumet, Yorick Tromp and Verena Stiegelbauer. РАЗРАБОТКА НОВЫХ МНОГОВИДОВЫХ ПРОБИОТИКОВ / Lukas Grumet, Yorick Tromp and Verena Stiegelbauer. // The Development of High-Quality Multispecies Probiotic Formulations: From Bench to Market. – 2020. - №12.
68. Захаров И.В., Лукин А.А. НАРИНАР – НОВЫЙ ПРОБИОТИК ДЛЯ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ / Захаров И.В., Лукин А.А.. // Технические науки. – 2021. – №3.
69. ТУ 10.51.36-001-86925285-2016. Биопродукт кисломолочный сухой «Наринар». Технические условия.
70. Захаров И.В. Результаты оценки безопасности и функциональности сухого биопродукта «Наринар» и его практическое применение / И.В. Захаров, В.В. Чаплинский, Е.И. Столбовая // АПК России. – 2017. № 24 (2). С. 443–449.
71. Байбаков В.И. Результаты оценки качества кефинарной биопродукции по содержанию бактериальных полисахаридов / В.И. Байбаков, И.В. Захаров, В.В. Чаплинский и др. // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2014. № 6 (29). С. 28–33.
72. Why Choose Bio-K+? [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://biokplus.com/pages/what-are-probiotics.
73. K Preston, R Krumian, J Hattner, D de Montigny, M Stewart, S Gaddam. Lactobacillus acidophilus CL1285, Lactobacillus casei LBC80R and

Lactobacillus rhamnosus CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study / K Preston 1, R Krumian, J Hattner, D de Montigny, M Stewart, S Gaddam. – 2018.

74. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(August 2014):506–14.

75. Bifidobacterium, UABla-12™ [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.chr-hansen.com/en/human-health-and-probiotics/our-probiotic-strains/uabla-12.

76. Шкредов В.В., Кощаев А.Г., Муртазаев К.Н., Юлдашбаев Ю.А., Сергиенкова Н.А. Разработка полиштаммовой лактосодержащей пробиотической добавки Галлобакт-Ф. Аграрная наука. 2020; 340 (7): 24–28.

77. Yarullina, D.R., Fakhrullin R.F. Bacteria of the genus Lactobacillus: general characteristics and methods of working with them: study guide. allowance. Kazan: Kazan University, 2014. 51 p. [in Russian]

78. Kurt Fenster, Barbara Freeburg, Chris Hollard, Connie Wong, Rune Rønhave Laursen, and Arthur C. Ouwehan. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach / Kurt Fenster, Barbara Freeburg, Chris Hollard, Connie Wong, Rune Rønhave Laursen, and Arthur C. Ouwehan. // Microorganisms. – 2019.

79. Gianfranco Donelli et al. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism: Microbial Ecology in Health & Disease 2013, 24: 20105

80. Désirée Tommasi. Bee diversity and abundance in an urban setting / Désirée Tommasi, Alice Miro. // The Canadian Entomologist. – 2004. – №136.

81. Min M., Bunt C.R., Mason S.L., Hussain M.A. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018:1–16

82. EU . *Regulation of the European Parliament and of the Council of Europe 5 April 2017 on Medical Devices, Amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and Repealing Council Directives 90/385/EEC and 93/42/EEC.* Volume 2017/745 European Parliament; Brussels, Belgium: Council of Europe; Brussels, Belgium: 2017.
83. John Davidson. The Difference Between Multi-Strain and Single-Strain Probiotic Supplements [Електронний ресурс] / John Davidson
84. Johnston B.C., Lytvyn L., Lo C.K., Allen S.J., Wang D., Szajewska H., Miller M., Ehrhardt S., Sampalis J., Duman D.G., et al. Microbial preparations (probiotics) for the prevention of clostridium difficile infection in adults and children: An individual patient data meta-analysis of 6851 participants. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2018;39:771–781.
85. Cohen, J. H. ; Sánchez, N. D. M. ; Montiel-ishinoet, F. D., 2009. Chapulines and food choices in rural Oaxaca. Gastronomica: the Journal of Food and Culture, 9(1): 61–65
86. Jakapat Vanichanan. Carbapenem-resistant Lactobacillus intra-abdominal infection in a renal transplant recipient with a history of probiotic consumption / Jakapat Vanichanan. // Infection. – 2016. – №44.
87. Sherid M., Salih S., Samian S., Husein H., Humberto S., Subbaramiah S. (2016). Liver abscess and bacteremia caused by *Lactobacillus*: role of probiotics? Case report and review of the literature. *BMC Gastroenterol*.
88. Boumis E., Capone A., Galati V., Venditti C., Petrosillo N. (2018). Probiotics and infective endocarditis in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: a clinical case and a review of the literature. *BMC Infect*
89. Aaron E. Carroll. The Problem With Probiotics [Електронний ресурс] / Aaron E. Carroll // The New York Times. – 2018.