

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

Декан _____ М. І. ГИЛЬ

« ____ » _____ 2021 р.

Рекомендувати до захисту

Зав. кафедри _____ С. І. ЛУГОВИЙ

« ____ » _____ 2021 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ІММОБІЛІЗАЦІЇ КЛІТИН
ПРОБІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ**

04.02. – ДР.003-О 21.02.03.002

Виконавець:

здобувач ІV курсу _____ **В. О. ЗУБЧЕНКО**

Наукові керівники:

доцент _____ **О. І. ЮЛЕВИЧ**

доцент _____ **С. І. ЛУГОВИЙ**

Рецензент:

директор Миколаївської регіональної
державної лабораторії ветеринарної
медицини _____ **В. І. МАЛАЙ**

Миколаїв 2021

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
1. Літературно-патентний огляд.....	8
1.1. Пробиотичні мікроорганізми: механізм дії, значення та застосування	8
1.2. Суть процесу іммобілізації, його особливості та переваги.....	13
1.3. Характеристика методів іммобілізації клітин пробіотиків	17
2. Експериментальна частина	24
2.1. Об'єкти і матеріали дослідження	24
2.1.1. Об'єкти дослідження	24
2.1.2. Методи дослідження.....	28
2.2. Результати та їх обговорення.....	30
3. Технологічна частина.....	37
4. Безпека життєдіяльності	43
ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	48

РЕФЕРАТ

Дипломна робота виконана на 53 сторінках комп'ютерного тексту, має 8 таблиць, 1 рисунок. При написанні роботи використано 51 літературне джерело.

Тема дипломної роботи: «Дослідження ефективності іммобілізації клітин про біотичних мікроорганізмів».

Об'єкти досліджень – ефективність іммобілізації мікроорганізмів *Streptococcus thermophilus* IMV B-7249 і *Lactococcus lactis ssp. lactis* 5739 на різних носіях.

Предмет досліджень – штами молочнокислих організмів *Streptococcus thermophilus* IMV B-7249 і *Lactococcus lactis ssp. lactis* 5739, носії для іммобілізації – желатин, натрію альгінат.

Метою досліджень роботи є встановлення ефективності іммобілізації мікрокапсульованих форм молочнокислих мікроорганізмів для їх подальшого використання у молокопереробній промисловості.

Для реалізації даної мети були поставлені такі завдання:

- обґрунтувати оптимальний спосіб і метод іммобілізації молочнокислих бактерій;
- провести технологічні дослідження з вибору оптимального адсорбенту-носія;
- виконати технологічні дослідження мікрокапсул.

Ключові слова: пробіотики, іммобілізація, мікрокапсулювання, молокопереробна промисловість, альгінат, хітозан, желатин, каолін.

В результаті проведених досліджень було створенно іммобілізовані форми пробіотичних штамів молочнокислих організмів на основі альгінату натрію та желатину, апробовано технологію мікрокапсулювання, а також досліджено доцільність та ефективність даної форми пробіотиків.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

B. – *Bifidobacterium*

E. – *Escherichia*

L. – *Lactococcus*

S. – *Streptococcus*

P. – *Propionibacterium*

ГКІ – гострі кишкові інфекції

ДСП – Державні санітарні правила

КУО – колонієутворюючі одиниці

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я

МРС (MRS) – середовище Мана-Рогоза-Шарпа

ПВС – полівініловий спирт

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

В даний час увагу науковців все більше привертає іммобілізація клітин, зокрема, в останні роки інтерес проявляється до отримання мікрокапсульованих форм мікроорганізмів пробіотиків з метою підвищення стресостійкості клітин до агресивних факторів.

Іммобілізовані бактерії більш стійкі до інактивуючих факторів зовнішнього середовища, в тому числі шлунково-кишкового тракту, що має значення при проходженні через шлунок і тривалому зберіганні.

Про значущість проблем підвищення життєдіяльності клітин мікроорганізмів, що використовуються в технологіях ферментованих продуктів, свідчать дослідження щодо збереження і збільшення кількості життєздатних клітин пробіотичних культур у процесах технологічних операцій виробництва, пов'язаних з механічними та тепловими зворотними процесами. Теоретично обґрунтовано та експериментально вивчено вплив окремих факторів, хімічних речовин та параметрів, активізуючих пробіотичну культуру в різних харчових середовищах, використовуваних у технологіях ферментованих продуктів для спеціалізованого та функціонального харчування.

У рамках розвитку харчової біотехнології у якісному ефективному методі захисту бактеріальних клітин пробіотичних культур рекомендується використовувати іммобілізацію. Метод рекомендується використовувати в біотехнологічних процесах виробництва пива та вина, а також у спеціалізованих та функціональних продуктах харчування [13, 21].

Іммобілізація клітин проводиться різними способами: зв'язуванням на твердому носії; включенням у структуру носія з використанням мембранної технології. Зв'язування твердого носія зазвичай відбувається за допомогою адсорбції або ковалентного приєднання. Серед методів просторового фіксування виділяють мікрокапсульювання та нашарування з використанням мембранної технології [49].

До переваг іммобілізації клітин мікроорганізмів можна віднести тривалу активність і стабільність іммобілізованих клітин, зниження ризику забруднення сторонньою мікрофлорою через високу щільність клітин. До того ж цей спосіб економічно доцільний, адже іммобілізація пробіотиків у харчовій промисловості також спрямована на подовження життєздатності клітин і на їх більш ефективне використання.

Використання пробіотиків у харчових продуктах у промислових масштабах включає в себе ряд мікробіологічних, технологічних і економічних проблем. Необхідні подальші дослідження з розробки відповідних технологій, матриць-носіїв і підбору бактеріальних штамів, що сприяють виживанню бактеріальних клітин в різних умовах обробки, а також при їх проходженні через верхні відділи шлунково-кишкового тракту.

Це заклало основу для проведення спрямованих досліджень для здійснення раціональних умов мікрокапсулювання пробіотичних культур, в тому числі це доцільно для молочнокислих культур з метою використання в харчовій промисловості [10].

На даний час існує певний асортимент іммобілізованих форм пробіотиків, проте іммобілізованих структур, які здатні були б забезпечити виражений пролонгований ефект і відрізнялися захищеністю від зовнішніх впливів і використовувалися в харчовій промисловості, в цьому переліку не так багато.

Таким чином, підбір відповідних технологій і дослідження з вибору оптимальних форм іммобілізованих пробіотиків цілком обґрунтоване і своєчасне.

Різні технології іммобілізації ще не повністю освоєні і вимагають додаткової експериментальної роботи для успішного впровадження в харчові технології. Дослідницькі зусилля повинні бути спрямовані на пошук оптимальних носіїв для іммобілізації, розширення наявних в даний час методів і подолання технологічних проблем виробництва.

Теоретична частина дипломної роботи полягає в створенні іммобілізованої форми пробіотичних штамів молочнокислих організмів,

використанні їх в мікрокапсульованому вигляді, а також дослідження доцільності та ефективності даної форми пробіотиків. Практична значимість роботи полягає в апробації запропонованої технології.

Таким чином, метою дипломної роботи є встановлення ефективності іммобілізації мікрокапсульованих форм молочнокислих мікроорганізмів для їх подальшого використання у молокопереробній промисловості.

Для реалізації даної мети були поставлені наступні завдання:

- обґрунтувати оптимальний спосіб і метод іммобілізації молочнокислих бактерій;
- провести технологічні дослідження з вибору оптимального адсорбенту-носія;
- виконати технологічні дослідження мікрокапсул.

1. ЛІТЕРАТУРНО-ПАТЕНТНИЙ ОГЛЯД

1.1. Пробиотичні мікроорганізми: механізм дії, значення та застосування

Пробиотичні мікроорганізми – це організми мікробного походження, які чинять при природному способі введення позитивний вплив на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму господаря за рахунок стабілізації і оптимізації функції мікробіоценозу кишечника [20, 24].

Ця група організмів включає бактерії, які апатогенні для людини, мають антагоністичну активність відносно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і забезпечують відновлення нормальної мікрофлори.

Початком ери пробіотиків можна вважати опублікування І. Мечниковим ще в 1908 році статті «Кілька слів про кисле молоко», де він довів, що кисле молоко, завдяки присутності в ньому болгарської палички, позитивно діє на мікрофлору кишечника і покращує травлення.

У 1917 р. професор А. Ніссле виділив з фекалій штам *E.coli*, який виявився непатогенним і придатним для витіснення протеолітичних мікроорганізмів (кlostридій) з кишечника, а також для лікування шлунково-кишкових захворювань.

Кисломолочні напої є одними з найстаріших продуктів і, напевно, найпоширенішими молочними продуктами, споживаними в усьому світі. З роками споживачі усвідомили переваги вживання ферментованих продуктів, що містять пробіотики. Метою їхнього виробництва і споживання є поліпшення здоров'я і зниження частоти виникнення шлунково-кишкових захворювань. Зростаюча популярність збагачених кисломолочних напоїв спонукає підприємства харчової промисловості і дослідників розробляти способи підвищення цінності продуктів для залучення споживачів, що піклуються про своє здоров'я. В даний час розроблені технології збагачених молочних напоїв, які передбачають збагачення продукту живими мікроорганізмами: в основному

лактобациллами і біфідобактеріями. Однак життєздатність пробіотиків і якість багатьох збагачених пробіотиками продуктів як і раніше є серйозною проблемою, оскільки кількість життєздатних пробіотиків і особливо біфідобактерій згодом зменшується в молочних продуктах під час зберігання і шлунково-кишкового транспортування [7].

Пробіотики впливають на кишкову флору шляхом збільшення числа корисних анаеробних бактерій і зменшенням популяції потенційно патогенних мікроорганізмів. Пробіотики впливають на шлунково-кишкову екосистему, стимулюючи імунні механізми слизової оболонки і неімунні механізми через антагонізм і суперництво з потенційними патогенами.

Вважається, що цей феномен викликає позитивні ефекти, що включають зменшення частоти і тяжкості діареї, і є однією з найбільш визнаних дій пробіотиків. Пробіотики зменшують ризик розвитку раку товстої кишки на тваринних моделях, ймовірно, за рахунок їх ролі у придушенні активності певних бактеріальних ферментів, які можуть підвищувати рівень прокарциногенів, але у людини цей факт не доведений.

Дія пробіотиків ґрунтується не тільки на корекції мікрофлори, а й на імуномодельючій активності та участі в обміні речовин.

На даний момент пробіотики і пробіотичні продукти використовують в наступних випадках:

- лікування захворювань, пов'язаних зі зміною мікрофлори (ГКІ у дітей і дорослих, кольпіти у жінок); корекція дисбактеріозу кишечника у дітей і дорослих та ін.;
- регуляція обмінних процесів в організмі шляхом підвищення активності метаболізму кишкової флори і власних обмінних процесів пробіотичних бактерій при колонізації кишечника;
- надання позитивного впливу на місцевий і системний імунітет, підвищення протиінфекційного захисту, імуномодельюча дія.

У список пробіотичних мікроорганізмів, які можуть надавати корисну дію, входять такі мікроорганізми як біфідобактерії і лактобактерії, кишкова

паличка, деякі дріжджові гриби, та ін [38,48,50,51]. Список відомих культур мікроорганізмів, які володіють пробіотичними властивостями, наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Культури пробіотичних мікроорганізмів

Біфідобактерії	Лактобактерії	Бацили	Інші мікроорганізми
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aerococcus viridans</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>		<i>Neisseria catarrhalis</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Lactobacillus GG</i>		

Основними пробіотиками, як випливає з даних таблиці 1, вважаються мікроорганізми продуценти молочної кислоти (біфідобактерії і лактобактерії), що відносяться до типових представників нормальної мікрофлори людини. За фізіологічним характеристикам дані мікроорганізми є факультативними анаеробами, енергетичні цикли яких проходять анаеробним шляхом, але вони здатні існувати в присутності кисню.

Відсутність і зменшення вмісту біфідобактерій і/або лактобактерій нижче нормального рівня є одним з патогенетичних факторів дисфункції кишечника і порушень фізіологічної діяльності багатьох органів і систем.

Біфідобактерії – це облигатно-анаеробні грампозитивні неспороутворюючі палички з роздвоєними кінцями. З кишечника здорових людей частіше за інших виділяються і вважаються найбільш фізіологічними для організму людини види *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve* і *B. adolescentis* [1, 2, 5].

Фізіологічна роль біфідобактерій багатопланова: нормалізація і стабілізація мікробіоценозу, формування колонізаційної резистентності кишечника; поліпшення процесів всмоктування, участь в білковому, ліпідному і мінеральному обміні; синтез амінокислот, білків і вітамінів; підтримка неспецифічної резистентності організму, стимуляція протиінфекційної імунної відповіді [5, 14, 25, 26].

Не менш значущим компонентом нормальної мікрофлори людини є бактерії роду *Lactobacillus* – грампозитивні поліморфні аспорогенні палички. Найбільш типові для організму людини види: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* [3, 11, 19].

Хоча лактобактерії становлять меншу частину флори кишечника, їх метаболічні функції роблять особливо значущою цю популяцію. Присутні практично у всіх відділах шлунково-кишкового тракту, лактобактерії вступають в складні взаємодії з іншими мікроорганізмами, що проявляється в придушенні зростання і розмноження умовно патогенної флори. Лактобактерії блокують рецептори клітин слизової оболонки кишечника від адгезивів патогенних мікробів, тобто забезпечують його колонізаційну резистентність. Вони розкладають вуглеводи з утворенням великої кількості молочної кислоти, продукують лізоцим, бактеріоцини і бактеріоциноподібні речовини, які здійснюють безпосередній вплив на мікроорганізми. Лактобактерії, як і біфідобактерії, мають виражену імуномодулюючу активність [4, 19, 17, 34].

З інших мікроорганізмів слід зазначити дріжджові гриби *Saccharomyces boulardii*. У природній мікробіоті кишечника *Saccharomyces boulardii* відсутні.

При потраплянні в організм їх стійка концентрація в товстому кишечнику досягається протягом трьох днів, після припинення прийому вони виводяться з кишечника протягом 2-5 днів. На відміну від мікробних пробіотиків, *Saccharomyces boulardii* завдяки своїй грибковому походженню володіють природною стійкістю до дії антибіотиків і не обмінюються ДНК (генами резистентності) з бактеріями.

Таким чином, *Saccharomyces boulardii* відносяться до групи пробіотиків, що самоілюмінуються – засобів, що містять живі мікроорганізми або продукти їх життєдіяльності, які нормалізують мікрофлору кишечника і при цьому не є її типовими постійними представниками або «конкурентами» нормальної мікрофлори. У той же час для них характерний прямий мікробний антагонізм по відношенню до різних патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і грибів, які порушують мікробіоценоз кишечника [30, 31, 40].

З метою забезпечення людини корисними мікроорганізмами створюються різні продукти на молочній основі. Це пов'язано з тим, що молоко є оптимальним субстратом для росту багатьох представників корисної мікрофлори – молочнокислих бактерій, біфідобактерій, кишкової палички, дріжджів. Крім того, посилено досліджуються пробіотичні властивості природних мікробних асоціацій, таких як грибкова культура для отримання кефіру, змішана асоціація дріжджів і молочнокислих бактерій для отримання кумису, айрану і т. д. Введення до складу кисломолочних продуктів спеціально селекціонованих штамів молочнокислих бактерій, біфідобактерій сприяє кращому засвоєнню кальцію в організмі людей різних вікових груп, зниження рівня холестерину в крові, забезпечує фізіологічну потребу організму у вітамінах, амінокислотах, антиоксидантах, активізує утворення мікробної лактази.

Таким чином, корисні властивості кисломолочних продуктів з пробіотичною активністю, разом з антагонізмом селекціонованих штамів мікроорганізмів закваски до збудників інфекцій, реалізуються і через стимуляцію біохімічних процесів в макроорганізмі, і через механізм

неспецифічної імуностимуляції. У той же час необхідно відзначити, що роль асоціативних культур в пробіотичних продуктах і формування імунної відповіді в макроорганізмі остаточно не вивчені та вимагають глибших досліджень [4, 14, 18, 34].

Критеріями оцінки ефективності продуктів-джерел пробіотиків служать емпіричні величини адекватного рівня споживання пробіотичних мікроорганізмів, які були апроксимовані шляхом узагальнення і аналізу даних про залежність настання сприятливого ефекту (нормалізація мікробіоти і поліпшення функції кишечника, підвищення неспецифічної резистентності організму) від рівнів вмісту індивідуальних штамів живих пробіотичних бактерій певних родів і видів.

Оптимальну дозу можна встановити для кожного пробіотика на підставі результатів клінічних досліджень. Мінімально достатньою є доза, здатна здійснювати значущу дію при регулярному споживанні, може вважатися від 10^7 КУО за добу до 10^8 - 10^9 КУО за добу у дорослих [12].

1.2. Суть процесу іммобілізації, його особливості та переваги

Іммобілізація, або інкапсуляція пробіотиків – це значна область на межі біотехнології та харчової технології, яка інтенсивно розвивалася в останні роки. У своєму життєздатному стані мікроорганізми-пробіотики чинять сприятливий вплив на здоров'я господаря.

Іммобілізовані клітини – такі клітини, для яких створені штучні обмеження рухливості в зовнішньому середовищі, а матеріальний посередник, що забезпечує ці обмеження рухливості, є носієм.

Терміни «іммобілізація» і «інкапсуляція» використовуються як взаємозамінні. Іммобілізація відноситься до захоплення матеріалу всередині або по всій матриці, в той час як інкапсуляція – це процес формування безперервного покриття навколо внутрішньої матриці, яка повністю утримується в стінці капсули в якості ядра інкапсульованого матеріалу. В обох

випадках повинна бути дозволена двонаправлена дифузія молекул, таких як приплив кисню, поживних речовин і факторів росту, необхідних для клітинного метаболізму і зовнішньої дифузії відходів.

Імобілізовані препарати за своєю ефективністю перевершують традиційні пробіотики на основі рідких або сухих культур біфідо- і лактобактерій. Терапевтичний і профілактичний ефект імобілізованих препаратів обумовлений спільною дією живих бактерій, а також захисними і детоксикаційними властивостями самого ентеросорбенту.

Імобілізовані бактерії більш стійкі до інактивуючих факторів зовнішнього середовища, в тому числі шлунково-кишкового тракту, що має значення при проходженні через шлунок і тривалому зберіганні. Ентеросорбент, крім функції доставки бактерій в кишечник, виконує і детоксикаційну функцію, зменшуючи метаболічне навантаження на органи детоксикації (печінка, нирки, імунна система). Все це призводить до синергетичного посилення терапевтичного ефекту [6, 13, 21].

Використання імобілізації дозволяє створити препарати, що володіють високою ефективністю і стабільністю. Імобілізація пробіотиків у харчовій промисловості також спрямована на подовження життєздатності клітин.

Оскільки рекомендується, щоб пробіотичні продукти містили достатню кількість живих бактерій (не менше 10^6 - 10^7 КУО/г) [12, 14, 36], харчова промисловість прийняла рекомендований рівень 10^6 КУО/г пробіотичних клітин на момент споживання. Таким чином, щоденне споживання не менше 10^8 - 10^9 життєздатних клітин, яке може бути досягнуто при щоденному споживанні не менше 100 г пробіотичної їжі, було запропоновано в якості мінімального споживання для забезпечення пробіотичного ефекту. Крім високої виживаності, пробіотичні культури також не повинні мати шкідливого впливу на сенсорні характеристики, наприклад, забезпечувати неприємний смак або текстуру.

Багато досліджень показали великі коливання і погану життєздатність пробіотичних бактерій і особливо біфідобактерій в харчових продуктах, таких

як йогуртові препарати. Стверджується, що кілька факторів впливають на життєздатність культур *Bifidobacterium* в кисломолочних продуктах, включаючи кислотність, рН, концентрацію молочної та оцтової кислот, перекис водню і вміст розчиненого кисню. Чутливість біфідобактерій до низьких значень рН і перекису водню в поєднанні з низькою життєздатністю в молочних продуктах при зберіганні при температурі охолодження залишається проблемою в більшості ферментованих продуктів [2, 13, 26]. Отже, промисловий попит на технології, що забезпечують стабільність біфідобактерій в харчових продуктах, як і раніше високий, оскільки висока виживаність клітин важлива як з економічної точки зору (при високій стабільності необхідно додавати менше клітин в продукт), так і з точки зору наслідків для здоров'я [8, 22, 23, 33].

Біфідобактерії також дуже чутливі до параметрів навколишнього середовища і вимагають дорогих середовищ для розмноження і додавання допоміжних чинників, через їх суворі вимоги до зростання [14]. Вони в основному продаються через ферментовані молочні продукти, які добре підходять для зміцнення здоров'я пробіотиками. Біфідобактерії не здійснюють негативного впливу на смак або аромат молочних продуктів і не посилюють підкислення протягом терміну придатності продукту. Також біфідобактерії захищені молочними білками під час травлення, що дозволяє краще засвоюватися організмом [19, 26].

Пробіотичні продукти з життєздатними мікроорганізмами здійснюють позитивний вплив на здоров'я. Наприклад, у бактерій є певні ендометаболіти, що не виводяться в середовище і їх складно отримати окремо поза клітинами. Наприклад, вітамін В₁₂ є ендометаболітом.

Доведено, що живі клітини міцно пов'язують всі мутагени (на відміну від убитих). Варто також відзначити здатність клітин живих пробіотичних мікроорганізмів до біосорбції важких металів. Так, наприклад, біфідо- і пропіоновокислі бактерії ефективно пов'язують кадмій і свинець при їх наявності в харчових продуктах. Те саме можна сказати і щодо дезактивації

ціаноксинів і мікотоксинів, а також до здатності пропіоновокислих бактерій нейтралізувати лектини, які руйнують слизову шлунково-кишкового тракту і викликають серйозні проблеми зі здоров'ям, включаючи аглютинацію еритроцитів і проліферацію клітин аденокарциноми товстої кишки. *P. freudenreichii* здатні видалити 60-70% конканаваліну А і якаліну з епітеліальних клітин кишечника, заміщуючи їх собою. Таким чином, бактерії з підвищеною життєздатністю є найбільш функціональним варіантом для створення молочної продукції і не тільки, що підтверджує важливість іммобілізації клітин [39, 42].

Методи іммобілізації часто імітують природу, адже природно багато мікроорганізмів мають здатність прилипати і виживати на різних видах поверхонь, і таким чином клітини можуть рости в межах природних структур.

До переваг іммобілізації клітин культур пробіотиків можна віднести:

- тривала активність і стабільність іммобілізованих клітин, оскільки носій іммобілізації може виступати в якості захисного агента від фізико-хімічних змін (рН, температура, солі жовчних кислот і т. ін.);
- більш висока щільність клітин, яка призводить до підвищення продуктивності і збільшення поглинання і виходу субстрату;
- підвищена стійкість до високої концентрації субстрату і пригнічення кінцевого продукту;
- зниження ризику мікробного забруднення через високу щільність клітин і підвищену активність бродіння;
- здатність до низькотемпературної ферментації і / або дозрівання для певних харчових продуктів;
- скорочення часу ферментації і дозрівання за певних умов [9, 10, 32].

Види іммобілізації клітин залежно від використовуваного фізичного механізму поділяються на:

- захоплення всередині пористої матриці внаслідок проникнення клітин до тих пір, поки їх рухливість не буде ускладнена присутністю інших клітин або утворенням пористого матеріалу в культурі клітин;

- прикріплення або адсорбція на поверхні твердого носія шляхом фізичної адсорбції під дією електростатичних сил або шляхом ковалентного зв'язування між клітинною мембраною і носієм;
- самоагрегація природною флокуляцією або викликаною штучно зшиваючими агентами;
- механічне стримування за бар'єром, який може бути або мікропористою мембраною, або мікрокапсулою.

Для захисту пробіотичних клітин активно використовується технологія мікрокапсулювання – іммобілізація пробіотичних бактерій в гелевих мікрокапсулах на основі альгілату кальцію, карагенану, желатину, хітозану, агарози, крохмалю, камеді, харчових рослинних волокон та інших матеріалів, які зберігають свою структуру в шлунку і надходять в кишечник. Мікрокапсульовані пробіотичні бактерії застосовуються при виробництві молочних продуктів (сир, йогурт, морозиво), а також для збагачення широкого спектру інших продуктів функціонального харчування [10].

1.3. Характеристика методів іммобілізації клітин пробіотиків

Клітинну іммобілізацію і її методи, що зустрічаються в літературних джерелах, можна розділити на три види: адсорбційна іммобілізація з використанням твердих носіїв; просторова іммобілізація шляхом включення в структуру самого носія і метод мембранної іммобілізації.

Адсорбційна іммобілізація може відбуватися з використанням різних реагентів і здійснюватися за допомогою ковалентних зв'язків.

Просторова іммобілізація являє собою власне мікрокапсулювання, включення в саму структуру гелю, а також можливе використання мембранних технологій.

Адсорбційна іммобілізація є найкращим методом для фіксації живих клітин, так як процес відбувається в найбільш м'яких умовах в порівнянні з просторовою іммобілізацією різними органічними полімерами.

Найбільш популярним є використання вугільних носіїв при створенні структур для адсорбційної іммобілізації живих мікроорганізмів. Таке застосування отримало розвиток в наступних напрямках:

- в медичній практиці для міцного зв'язування патогенних мікроорганізмів;
- при біосинтезі різних з'єднань за допомогою використання біореакторів з іммобілізованими клітинними структурами;
- створення біофільтрів для очищення стічних вод і повітря від різних органічних сполук і газів;
- при видобутку і переробці природних копалин для поліпшення їх властивостей (вилуговування металів з руд, збільшення плинності нафти та ін.) [9, 10, 43, 49].

Що стосується використання адсорбції для іммобілізації пробіотичних клітин, запатентований склад і метод отримання препарату-пробіотика. Комплексний препарат-пробіотик включає носій, що представляє собою пористий ентеросорбент СУМС-1 на основі оксиду алюмінію і клітин бактерій-еубіотиків (*B. bifidum* 8-3, *B. longum* ДВА-13 і *B. adolescentis* ГО-13) з живильним і захисним середовищами, іммобілізовані на зазначеному носії [9, 37].

Запатентований спосіб отримання бактеріального препарату на основі штамів пробіотиків, у процесі здійснення якого використовується іммобілізація на цеолітах і мікрокристалічній целюлозі.

Для здійснення просторової іммобілізації клітин мікроорганізмів як носії зазвичай використовують різні носії органічної або неорганічної природи у вигляді гелів, плівок, волокон. Найчастіше в основу входять такі матеріали як желатин, альгінат, колаген, карагенан, агар, хітозан, поліуретан, целюлоза, полівініловий спирт та ін. [35, 49].

Лише деякі носії для іммобілізації вважаються придатними у використанні для виробництва продуктів харчування. У виробництві функціональних харчових продуктів найбільше застосовують природні полісахариди для іммобілізації клітин мікроорганізмів. До полісахаридів, які

використовуються у харчовій промисловості, відносяться: крохмаль, похідні целюлози, хітозан, альгінат, пектин, карагенан, пуллулан, ксантанова камедь і ін. Такі полісахариди служать якісними кисневими, ароматичними і олійними бар'єрами, також володіють хорошими механічними властивостями.

Для іммобілізації лактобактерій, які використовуються у виробництві сирів, йогуртів, кефіру та інших молочнокислих продуктів, метаболітів, в т.ч. молочної кислоти, а також для отримання препаратів-пробіотиків і збагачених продуктів харчування, досить часто використовуються методи включення в структуру гелю. При виборі носія для потреб харчової промисловості враховуються такі вимоги: відсутність токсичності, доступність і невисока вартість [35].

Виходячи з цих вимог, використовуються такі полімери як карагенан, агар, желатин, хітозан і альгінат. Перевагою цих полімерів є також те, що вони можуть служити додатковим харчовим компонентом. Показано, що клітинна іммобілізація в карагенані і альгінаті забезпечує ефективний захист лактобактерій від можливої загибелі в процесі заморожування-відтавання – технологічної операції отримання пробіотиків, що сприяє збереженню їх стабільності в процесі зберігання та ферментації. Крім того, іммобілізовані клітини відрізняються кращими ферментативними характеристиками в порівнянні з нативними [32, 35, 43].

Перевагами іммобілізації лактобактерій є не тільки підвищення стійкості в технологічному циклі, але і збільшення термінів зберігання препаратів і продуктів харчування.

Матеріалом, найбільш часто використовуваним для іммобілізації бактеріальних клітин, є природний полісахарид альгінат натрію, головним чином через його безпеку, гарні гелеутворюючі властивості і біосумісність. В даний час іммобілізація клітин мікроорганізмів шляхом включення в гель альгінату визнана найбільш ефективною і поширеною.

Альгінати, які є природними аніонними полісахаридами, що складаються із залишків D-маннуринової і L-гулуринової кислот, лінійно з'єднаних (1-4)

глікозидними зв'язками, вважаються безпечними для вживання в їжу. З фізіологічної точки зору, головна перевага альгінату полягає в тому, що іммобілізовані клітини не зазнають різких змін фізико-хімічного стану під час процедури іммобілізації, а гель є прозорим і проникним. Альгінат використовувався для приготування багатошарових кульок гідрогелю, що захищають пробіотичні бактерії *Bifidobacterium breve* в умовах низького рН шлункового соку. Клітини пробіотиків були інкапсульовані в сферичні кульки з альгінату кальцію, використовуючи емульсійний метод. Отримані кульки з інкапсульованими пробіотичними клітинами, а також вільні клітини піддавали впливу середовищ з різними значеннями рН, які імітують умови шлункового соку і кишкової рідини. Життєздатність клітин *B. breve*, інкапсульованих в гранули альгінату кальцію, в порівнянні з життєздатністю вільних клітин була значно вище. Як зшиваючі агенти при даній іммобілізації найчастіше використовують катіони стронцію, кальцію і барію, які заміщають натрій в солі альгінової кислоти [45, 46, 47].

Також можлива стабілізація різними полімерами (поліетиленаміни, поліакриламід, полівініловий спирт і ін.) гранул альгінату шляхом поперечної зшивки карбоксильних груп, що призведе до підвищення стабільності іммобілізованої структури [6].

У дослідженні А. В. Коркач і ін. [7], біфідобактерії *Bifidobacterium bifidum* були включені в гель біополімеру пектину, в результаті чого клітини бактерій зв'язувалися в полімерну сітку, зшиту хімічними і фізичними зв'язками полімеру. Клітини, іммобілізовані в гелі біополімеру пектину, характеризувалися великою стабільністю в агресивному середовищі шлунку і дванадцятипалої кишки, в порівнянні з вільними клітинами. Як впливає з результатів експерименту, їхня здатність до виживання в шлунково-кишковому тракті становила 57-78%.

Ще одним з цікавих матеріалів для іммобілізації клітин мікроорганізмів є агар, який успішно застосовується в різних областях і використовується в основному при культивуванні мікроорганізмів.

Складові компоненти агару мають спорідненість з речовинами захисних оболонки клітин мікроорганізмів, що дозволяє забезпечити захист мікробних клітин від несприятливих впливів зовнішнього середовища і здійснювати тривале зберігання мікробних культур [35, 49].

ПВС – перспективний носій клітин мікроорганізмів при заморожуванні утворює кріогель з безліччю пор різного калібру. Особливість такої просторової структури сприяє оптимальному транспорту метаболітів, кисню та інших необхідних молекул субстрату. Дана структура володіє міцністю і стійкістю до стирання, що дозволяє використовувати її в різних областях.

Однак, дифузійні обмеження, що впливають на клітини мікроорганізмів щодо перешкоди поділу клітин, дифузії кисню і субстрату в центрі великих гранул, є певним недоліком такої структури. Концентрація мікробної маси в даному випадку не може перевищувати 25% від загального обсягу.

Незважаючи на такі недоліки, дана іммобілізація широко застосовується в різних виробництвах.

Мембранні технології, використовувані при іммобілізації мікробних клітин, реалізуються із застосуванням таких систем, як мікрокапсули, порожнисті і пористі волокна, мембрани різної проникності. Це дозволяє локалізувати біомасу мікроорганізмів, перешкоджаючи її поширенню за межами певної ділянки системи таким чином, що вони не є пов'язаними з певним носієм.

Як приклад використання плоских мембран можна привести бактерицидні фільтри, які перешкоджають проникненню мікроорганізмів в навколишнє середовище. Даний стан мікроорганізмів порівняно з системою вільного суспендування.

Порожні і пористі волокна представлені порожніми трубками зі стінками з полімерних мембран, зовні яких знаходяться клітини мікроорганізмів, продуценти яких безперешкодно потрапляють у внутрішні канали трубок.

Мікрокапсулювання також можна віднести до мембранних технологій. Система являє собою біомасу, укладену в напівпроникну мембрану, при цьому

самі клітини мікроорганізмів залишаються просторово обмеженими, а розчинені речовини безперешкодно проходять крізь мембрану.

З 1993 року технологія мікрокапсулювання використовується як альтернатива методу іммобілізації в гель через відсутність витоку клітин мікроорганізмів в навколишнє середовище і високою клітинної концентрації. Це дозволяє істотно скоротити виробничі витрати [10, 18].

Наявність мембрани сприяє створенню комфортних умов для клітин мікроорганізмів і створює захисний бар'єр від токсичної зовнішньої фази. Міцність оболонки капсули дозволяє довго використовувати такі системи і зберігати їх в придатному стані.

Мікрокапсулювання також дозволяє збільшити стійкість пробіотиків до агресивних факторів ШКТ – низького рН-середовища шлунку, дії ферментів, жовчі [10].

Пробіотики найчастіше піддаються мікрокапсулюванню модифікованим методом Равула і Шаха (метод виливання з альгінатом натрію і зшивкою кальцію хлоридом крапельним методом) [6].

Основні речовини, використовувані для мікрокапсулювання пробіотиків – це альгінат і його поєднання. Для мікрокапсулювання використовується кальцію альгінат в концентрації 0,5-4,0%. Альгінати легко формують оболонку навколо бактерії, нетоксичні для організму, нескладні технологічно, легко розчиняються в шлунково-кишковому тракті і вивільняють бактерії.

Проте вони мають і ряд недоліків. Наприклад, вони чутливі до кислого середовища і схильні до руйнування в ньому. Крім того, якщо в середовищі знаходяться фосфат-, лактат-, цитрат-іони, які реагують з кальцієм, стабільність мікрокапсул порушується. Для використання таких капсул, наприклад, в молочних продуктах, необхідно розробляти додаткові операції, що призводять до їх зміцнення [45, 46, 49].

Показано, що обробка альгінатних капсул 0,5% розчином хітозану забезпечувала поліпшення якості та стабільності капсул. Це можна пояснити появою оболонки поліелектролітного комплексу на поверхні з можливим

подальшим поширенням реакції між макромолекулами поліелектролітів вглиб ядра капсул [35, 49].

До інших недоліків можна віднести складності промислового виробництва, пов'язані з високою вартістю і недостатньою міцністю мікрокапсул. Останнє пов'язано зі здатністю легко пропускати вологу і рідини, що погіршує захисні властивості мікрокапсул.

Всі ці властивості можуть бути виправлені за рахунок додавання інших полімерів, наприклад, крохмалю. Крім того, як стабілізатори альгінатних капсул використовуються амінокислоти і гліцерин, який може виконувати також функцію кріопротектора.

Крохмаль як компонент оболонки мікрокапсул використовується самостійно, і в поєднанні з альгінатами. Перевага віддається модифікованим крохмалю, що володіють стійкістю до панкреатичної амілази. Суміш ксантан-желатин, використовувана для мікрокапсулювання, характеризується стійкістю в кислому середовищі.

Карагенан може використовуватися для мікрокапсулювання пробіотиків в продуктах молочнокислого бродіння. Полімери хітозану можуть використовуватися в поєднанні з іншими інгредієнтами або як самостійні плівкоутворювачі. Гелі хітозану утворюються в присутності солей кальцію або поліонів. Желатин може використовуватися для мікрокапсулювання пробіотиків в чистому вигляді або в поєднанні з іншими біополімерами [10, 35, 41, 44].

Отже, для іммобілізації клітин пробіотичних мікроорганізмів на даний використовується багато різних способів та методик, проте іммобілізованих структур, які здатні були б забезпечити виражений пролонгований ефект і відрізнялися захищеністю від зовнішніх впливів існує не так багато, що і зумовлює доцільність проведення подальших досліджень.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Об'єкти і матеріали дослідження

2.1.1. Об'єкти дослідження

У роботі використовували виробничі штами: *Streptococcus thermophilus* IMV B-7249 і *Lactococcus lactis ssp. lactis* 5739.

Streptococcus thermophilus – вид грампозитивних факультативно анаеробних бактерій. Клітини *Streptococcus thermophilus* мають форму коків, які розташовані у вигляді довгих ланцюжків. Відноситься до α -гемолітичних стрептококів. Оптимальна температура розвитку *Streptococcus thermophilus* у межах 38-42°C.

Streptococcus thermophilus відноситься до групи молочнокислих бактерій, які зброджують вуглеводи з утворенням молочної кислоти. Завдяки цій властивості мікроорганізми широко використовуються в харчовій промисловості при виготовленні різних молочних продуктів, особливо ряжанки, йогуртів, моцарели і інших сирів.

На щільних середовищах утворюють дрібні плоскі сіруваті колонії, на рідких середовищах формують мілкий пристінковий і придонний ріст, на кров'яному агарі – зони альфа- або бетагемолізу. Добре ростуть в бульйоні MRS.

Бактеріальні клітини лактококів – факультативні анаероби, являють собою нерухомі коки (в молодому вигляді можуть повторювати форму стрептокока), які не утворюють спор. Клітини сферичні або овальні розміром 0,5-1,2 мкм, з'єднані попарно (диплококи) або у вигляді коротких ланцюжків. Можуть утворювати як точкові колонії, так і сочевицеподібні. Округлі росинчасті колонії з рівним краєм утворюються на поверхні середовища, а чечевицеподібні чи човникоподібні колонії – врастають в агар. Оптимальна температура розвитку становить 28-32°C [36].

Lactococcus lactis 5739 – гомоферментативний штам, який виробляє L-лактат в мезофільних умовах росту (30°C, рН 7). Даний вид бактерій в результаті життєдіяльності розкладає молекули цукру на молекули молочної кислоти, при цьому не утворюючи газу.

Активні штами цього виду згортають молоко за 4-6 годин, утворюючи рівний щільний згусток. Гранична кислотність (через 5-7 діб розвитку в молоці) досягає 125 °Т. *Lac. lactis ssp. lactis* не росте в середовищах з 6,5% NaCl і в лужному середовищі з рН 9,5. Штами виду *Lac. lactis* входять до складу заквасок, які використовують для виготовлення ряжанки, сиру, сметани, кисловершкового масла та ін. [19].

У роботі були використані наступні реактиви та допоміжні речовини:

- вода очищена;
- желатин медичний;
- калію дигідрофосфат (KН₂PO₄), категорія «х.ч.»;
- кальцію хлорид категорія «х.ч.»;
- кислота хлористоводнева, категорія «х.ч.»
- натрієва сіль альгінової кислоти;
- каолін;
- хітозан.

При виконанні досліджень використовувалася необхідна апаратура, призначена як для визначення властивостей використовуваних об'єктів, так і для стандартизації розроблених препаратів:

- ваги для сипучих матеріалів;
- ваги лабораторні;
- ваги ручні;
- вібраційний пристрій моделі ВП-12А;
- гідравлічний прес;
- комплект гир;
- лабораторний рН-метр;
- набір сит для дослідження фракційного складу;

- прилад для визначення об'ємної щільності (насипної маси);
- секундомір;
- термостат електричний сухоповітряний;
- автоклав;
- магнітна мішалка.

При створенні продуктів, збагачених пробіотиками, у багатьох випадках перевага віддається мікрокапсулюванню, оскільки цей метод дозволяє підвищити стійкість клітин мікроорганізмів до низького рН середовища, ферментів і жовчі, антибактеріальних препаратів, бактеріофагів, до заморожування і ліофілізації в процесі виробництва.

Перевагою мікрокапсульованих форм пробіотиків є також можливість забезпечення рівномірного дозування, що досягається в тому числі і включенням в капсули. Тому оптимальним методом для досліджень в області іммобілізації мікроорганізмів *S. thermophilus* та *L. lactis* було обрано мікрокапсулювання.

Важливим етапом є підбір для цього відповідного матеріалу.

Альгінат натрію – гетерополісахарид морських водоростей, утворює в'язкі розчини в присутності іонів кальцію. Для іммобілізації пробіотиків широко використовується поперечнозшитий кальцію хлоридом альгінат кальцію. Альгінатні мікрокапсули мають ряд переваг – легко формують оболонку навколо бактеріальної клітини, нетоксичні для організму, дешеві, володіють бажаними технологічними характеристиками (температура гелеутворення), легко вивільняють мікроорганізми в кишечнику. Однак вони мають і ряд недоліків. Наприклад, нестійкі в кислому середовищі, чутливі до присутності в середовищі хелатуючих агентів – цитрат-, фосфат-, лактат-іонів, які взаємодіють з іонами кальцію, порушуючи цілісність оболонки [46, 47].

До інших труднощів отримання мікрокапсул з альгінату є утворення мікропор і мікротріщин в оболонці, що також зменшує їх стабільність. Цей недолік може бути усунутий шляхом додавання інших полімерів до складу

оболонки, наприклад, хітозану та ін. Доведено, що обробка альгінатних капсул 0,5% розчином хітозану забезпечувала поліпшення стабільності мікрокапсул.

Хітозан в концентрації 0,4% використовується як компонент оболонки мікрокапсул. Хітозан може полімеризуватися шляхом формування поперечного зв'язку в присутності аніонів та поліаніонів. Хітозан застосовується зазвичай як покриття-оболонка для мікрокапсул, отриманих з інших полімерів [49].

Желатин – природний полімер білкової природи, може використовуватися для мікрокапсулювання пробіотиків як самостійно, так і в суміші з іншими полімерами. Капсули, одержані з цього матеріалу, на відміну від альгінатних, більш стійкі в кислих умовах шлунка.

Для збільшення стабільності біомаси бактерій до складу порошку необхідно вводити допоміжні речовини. Основний шлях підвищення технологічних властивостей ліофілізатів полягає в підборі речовин-вологорегуляторів, що забезпечують зниження гігроскопічності і поліпшення сипучості даної біологічної субстанції. При цьому розробка оптимального складу порошку для наповнення желатинових капсул проводилася як з урахуванням особливостей капсульної форми, так і технічних особливостей капсулювання препарату.

Введення допоміжних речовин дозволяє знизити гігроскопічність, поліпшити технологічні параметри порошку, необхідні для його оптимального і точного дозування в желатинові капсули і забезпечують його стабільність в процесі зберігання.

Каолін в кількості 20% від маси ліофілізату був визнаний більш перспективним варіантом допоміжної речовини. Збільшення його вмісту не приводить до істотного зниження гігроскопічності і зменшує насипну щільність порошку. В кількості не менше 20% від кількості сухої біомаси бактерій каолін забезпечує ефект, який виражається в зниженні адгезії порошку, що особливо важливо при високій швидкості капсулювання [49].

З огляду на вищенаведене, для дослідження були обрані доступні та екологічні полімери: альгінат, хітозан, желатин і каолін

Існує два способи мікрокапсулювання клітин – спосіб екструзії (крапельний) і спосіб звернення фаз. Крапельний більш простий і доступний, тому саме цей спосіб використовувався в дослідженні.

2.1.2. Методи дослідження

Технологічні методи. Для іммобілізації клітин шляхом включення (мікрокапсулювання) в гель альгінату кальцію використовувалася методика, запропонована Кірстеном і Б'юком. Згідно з методикою суспензію клітин змішують з рівним об'ємом 4% розчину альгінату натрію і дозують за допомогою екструзії через форсунку в 0,2 М розчин кальцію хлориду, який беруть в десятикратному надлишку від обсягу суміші. Утворені частки альгінату кальцію витримують в розчині зшиваючого агента протягом 20 хвилин для затвердіння.

Всі необхідні реологічні, технологічні та структурно механічні характеристики мікрокапсул визначали за відомими методиками.

Фракційний склад отриманих мікрокапсул було досліджено за допомогою ситового аналізу і сит з різними розмірами отворів. Для цього 50 г мікрокапсул поміщали на відповідне сито, забезпечене щільно прилеглим прийомним лотком і кришкою, струщували протягом 10 хвилин, періодично постукуючи по сити. Потім проводили зважування фракції, що залишилася на ситі. Зміст фракцій виражали у відсотках від маси зразка [6, 15].

Визначали об'ємну щільність мікрокапсул, тобто масу одиниці об'єму вільно насипаних мікрокапсул. Її визначали шляхом вільного насипання мікрокапсул в ємність певного об'єму зі стандартним ущільненням.

Величина залежить від розміру, форми частинок, вологості, сил зчеплення між частинками. Об'ємну щільність визначали за формулою:

$$\rho = \frac{m}{V}, \text{ г/см}^3, \quad (1)$$

де: ρ – об'ємна щільність;

m – маса грануляту, г;

V – об'єм грануляту в циліндрі, г/см³

Для визначення істинної щільності наважки мікрокапсули заливали спиртом етиловим і заміряли отриманий об'єм.

Сипучість мікрокапсул визначали за швидкістю висипання матеріалу. Сипучість виражають як середню швидкість витікання матеріалу через отвір воронки певного діаметру. Дослідження проводили на вібраційному пристрої, основною частиною якого є воронка з кутом конуса 60° і носиком, зрізаним під прямим кутом на відстані 3 мм від кінця конуса воронки. У воронку завантажували 100,0 г грануляту і засікали час висипання за секундоміром, проводили 10 визначень і за остаточний результат брали середнє арифметичне. Сипучість характеризується швидкістю висипання V_c , яка розраховується за формулою:

$$V_c = \frac{m}{t}, \quad (2)$$

де: V_c – сипучість, г/с;

m – маса наважки, г;

t – час повного висипання, с.

За допомогою вібраційного приладу визначали також кут природного укосу – кут, що утворюється між конусом з сипучого матеріалу і горизонтальною площиною.

Чим краще пресованість, тим вище при рівних умовах міцність таблеток. Пресованість речовин можна визначити через коефіцієнт пресованості. Чим вище його значення, тим краще пресованість. Для визначення коефіцієнта пресованості наважку грануляту масою 0,2 г пресували в матриці з діаметром отвору 10 мм на гідравлічному пресі під тиском 120 МПа [6, 15, 16].

Мікробіологічні методи. Оцінку біологічної активності і зберігання препаратів на основі іммобілізованих бактерій проводили шляхом визначення біологічної концентрації мікроорганізмів методом висіву на щільне поживне середовище. Загальну концентрацію мікроорганізмів оцінювали за рахунком в камері Горяєва і за оптичною концентрацією, визначену за стандартом мутності.

2.2. Результати та їх обговорення

Результати проведених досліджень оброблялися статистично за допомогою програми Microsoft Excel з використанням параметричного t-критерія Стьюдента.

В ході дослідження при іммобілізації клітин утворювалися мікрокапсули з альгінату та желатину, що мають неоднаковий діаметр. Маса мікрокапсул альгінату натрію з хітозаном склала 0,9-1,2 мг, маса мікрокапсул з желатином – 1,0-1,4 г.

Був досліджений фракційний склад отриманих мікрокапсул. Фракційний склад надає певний вплив на сипучість і на точність дозування. Найбільш швидким і зручним методом визначення дисперсності є ситовий аналіз. Результати ситового аналізу представлені в таблицях 2 і 3, знаком «+» позначали фракцію, що залишилася на ситі, а знаком «-» – яка пройшла через сито.

Таблиця 2

Результати ситового аналізу мікрокапсул мікроорганізмів, утворених альгінатом натрію

Діаметр отворів сита, мм	Вміст фракцій мікрокапсул <i>S. thermophilus</i> з альгінатом, %		Вміст фракцій мікрокапсул <i>L. lactis</i> з альгінатом, %	
	+	-	+	-
5,0	0	100	0	100
2,0	0	100	0	100
1,0	0	100	0	100
0,5	100	0	100	0

Як випливає з даних таблиці 2, мікрокапсули з альгінату пройшли через всі сита за винятком останнього, що має діаметр отворів 0,5 мм. Попереднє сито мало отвори діаметром 1 мм. Це дозволяє зробити висновок про те, що

розмір мікрокапсул з альгінатом знаходяться в межах 0,5-1,0 мм.

Модифікація мікрокапсул хітозаном істотно не впливала на їх розмір, про що свідчать результати таблиці 3.

Таблиця 3

Результати ситового аналізу мікрокапсул мікроорганізмів, утворених альгінатом натрію і модифікованих хітозаном

Діаметр отворів сита, мм	Вміст фракцій мікрокапсул <i>S. thermophilus</i> з альгінатом і хітозаном, %		Вміст фракцій мікрокапсул <i>L. lactis</i> з альгінатом і хітозаном, %	
	+	-	+	-
5,0	0	100	0	100
2,0	0	100	0	100
1,0	100	0	100	0
0,5	0	0	0	0

У всіх зразках були відсутні частинки розміром менше 0,4 і більше 2,0 мм, що позитивно впливає на точність дозування за об'ємом.

Далі проводили ситовий аналіз мікрокапсул, утворених із желатином та каоліном (табл. 4).

Таблиця 4

Результати ситового аналізу мікрокапсул мікроорганізмів, утворених желатином з допоміжною речовиною каоліном

Діаметр отворів сита, мм	Вміст фракцій мікрокапсул <i>S. thermophilus</i> з желатином і каоліном, %		Вміст фракцій мікрокапсул <i>L. lactis</i> з желатином і каоліном, %	
	+	-	+	-
5,0	0	100	0	100
2,0	0	100	0	100
1,0	90	10	90	10
0,5	0	90	0	90

З даних таблиці видно, що невелика частина мікрокапсул не пройшла через сито з діаметром отворів 1 мм, і 90% мікрокапсул не пройшли через сито з діаметром отворів 0,5 мм. Таким чином, у всіх зразках розміри мікрокапсул знаходяться в межах 0,6-1,1 мм.

Далі визначали такий параметр як об'ємна щільність, тобто маса одиниці об'єму вільно насипаних мікрокапсул (табл. 5). Її визначали шляхом вільного насипання мікрокапсул в ємність певного об'єму зі стандартним ущільненням. Для цього зважували 5 г досліджуваних мікрокапсул з точністю до 0,001 г і засипали їх в вимірювальний циліндр, після чого трясли мікрокапсули протягом 20-30 секунд. Після чого вимірювали об'єм, який займають мікрокапсули. Об'ємну щільність визначали як відношення взятої для випробувань наважки до певного обсягу.

Таблиця 5

Результати визначення об'ємної щільності отриманих мікрокапсул

Склад мікрокапсул	Об'ємна щільність, кг/м ³	Істинна щільність, кг/м ³
Альгінат	945	1540
Альгінат+хітозан	910	1520
Желатин+каолін	1120	1635

Для визначення істинної щільності наважки мікрокапсули заливали спиртом етиловим і заміряли отриманий об'єм. Величину істинної щільності визначали як добуток величин маси зразка мікрокапсул і різниці об'ємів суміші мікрокапсул зі спиртом і взятого етилового спирту.

Модифікація поверхні хітозаном призводила до зниження об'ємної щільності гранулятів у межах 4,7-4,8%. Справжня щільність мікрокапсул з альгінатом натрію склала 1540 кг/м³, мікрокапсул альгінату, модифікованих хітозаном 1520 кг/м³.

У випадку желатинових мікрокапсул з каоліном отримали кращі показники об'ємної щільності, яка склала 1120 кг/м³.

Далі вивчали такий параметр, як сипучість мікрокапсул. Сипучість, тобто здатність порошкоподібної системи висипатися з ємкості або «текти» під силою власної ваги і забезпечувати рівномірне заповнення матричного каналу, визначали за швидкістю висипання матеріалу на вібраційному пристрої моделі ВП-12А. Результати представлені в таблиці 6.

Таблиця 6

Результати визначення сипучості отриманих мікрокапсул

Варіанти мікрокапсул	Сипучість, кг/с
Альгінат	0,0113
Альгінат + хітозан	0,0102
Желатин + каолін	0,0097

Таким чином, всі досліджувані зразки мікрокапсул мають відмінну сипучість (у межах 0,0086-0,0120 кг/с), що дозволяє прогнозувати рівномірне заповнення і незначні коливання маси і щільності одержуваних таблеток.

За допомогою приладу ВП-12А визначали також кут природного укусу – кут між утворюється конусом з сипучого матеріалу і горизонтальною площиною, який є показником, що визначає потенційну сипучість матеріалу. Для мікрокапсул альгінату величина кута природного укусу склала 31°, а для мікрокапсул альгінату модифікованих хітозаном – 33°. Для мікрокапсул желатину з каоліном величина кута природного укусу склала 34°. Отримані величини незначно перевищували верхню межу для добре сипучих матеріалів (30°). Модифікація поверхні мікрокапсул хітозаном не чинила помітного впливу на величину кута природного укусу.

Оскільки досліджувані мікрокапсули володіють високими технологічними параметрами, була розглянута можливість їх таблетування методом пресування. З цією метою визначали пресованість.

Пресованість – це здатність частинок матеріалу до взаємного притягання і зчеплення під тиском, характеризується міцністю і стійкістю таблеток після зняття тиску. Чим краще пресованість, тим вище при рівних умовах міцність

таблеток. Пресованість речовин можна визначити через коефіцієнт пресованості. Чим вище його значення, тим краще пресованість.

Для визначення коефіцієнта пресованості наважку грануляту масою 0,2 г пресували в матриці з діаметром отвору 10 мм на гідравлічному пресі під тиском. Коефіцієнт пресованості розраховували як відношення маси отриманої таблетки (г) до висоти цієї таблетки (мм). Результати представлені в таблиці 7.

Таблиця 7

Результати визначення коефіцієнта пресованості отриманих мікрокапсул

Варіанти мікрокапсул	Пресованість, кг/с
Альгінат	0,157
Альгінат + хітозан	0,0154
Желатин + каолін	0,0172

З даних таблиці 7 видно, що найкращою пресованістю володіли мікрокапсули желатину.

Пресованість може бути оцінена за міцністю таблетки на стиск, чим вище міцність таблетки, тим краще пресованість і формування таблетки.

В результаті було визначено, що отримані з досліджуваних мікрокапсул таблетки мають незадовільну міцність: вже при застосуванні легкого зусилля цілісність таблеток порушувалася і таблетки деформувалися.

На підставі отриманих результатів було зроблено висновок про те, що отримання таблеток з прямим пресуванням не є можливим через низьку пресованість і великий гранулометричний склад. Більш кращим виглядає варіант використання досліджуваних гранул як самостійно використовувану форму (у вигляді порошку).

Таким чином, при вивченні технологічних характеристик (сипучість, об'ємна щільність, пресованість) варіантів капсулюючих порошоків на основі іммобілізованих бактерій встановлено, що найбільш доцільним є моделювання складу композицій з використанням наповнювачів. Експериментально встановлено, що оптимальним наповнювачем є каолін в кількості 20% від маси

ліофілізату, що забезпечує отримання порошку з технологічними властивостями, що задовольняють вимоги виробництва. Зразки, що містять каолін, мають високу ступінь ущільнення, що дозволяє при об'ємному способі дозування і підпресування порошку сформувати мінімальну дозу, яка містить необхідну кількість життєздатних клітин для оптимального наповнення капсули.

Капсули, що містять в якості сорбенту альгінат натрію, мають більш аморфну структуру за рахунок наявності полісахаридів, мають більш низькі показники об'ємної щільності.

Отримані експериментальні зразки капсул упаковували в герметично закриті полімерні банки.

З метою вивчення стабільності капсульної форми пробіотика на основі іммобілізованих бактерій експериментальні зразки капсул були закладені на зберігання при температурі $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ і регулярно контролювалися за основними показниками: зовнішній вигляд, втрата в масі при висушуванні, рН, життєздатність бактерій.

Результати контролю фізико-хімічних і біологічних параметрів капсул на основі іммобілізованих бактерій представлені в таблиці 8.

В усіх зразках мікрокапсул кількість життєздатних бактерій становила не менше 8×10^8 КУО/г до кінця терміну спостереження. Втрати маси при висушуванні знаходилися в допустимих межах, рН протягом всього терміну спостереження залишався у межах норми (5,5-6,5).

На підставі позитивних результатів вивчення стабільності якісних параметрів препарату можна зробити висновок про придатність розробленої рецептури і технології капсульної форми препарату на основі іммобілізованих клітин.

Варіанти капсул з желатином, альгінатом, модифіковані хітозаном, та з альгінатом показали гарні результати і довели доцільність свого використання. Але при порівнянні желатинових та альгінатних мікрокапсул перевага

надавалася желатиновим мікрокапсулам, що містять каолін, оскільки вони мали більш високий ступінь ущільнення.

Таблиця 8

Параметри мікрокапсул на основі іммобілізованих бактерій

Варіант мікрокапсул	Термін зберігання, міс	Втрати маси при висушуванні, %	pH	Кількість життєздатних бактерій <i>S. thermophilus</i> (в 1 г не менше 10^8 КУО)	Кількість життєздатних бактерій <i>L. lactis</i> (в 1 г не менше 10^8 КУО)
Альгінат натрію	0	1,6	6,17	$(8,98 \pm 0,48) \times 10^8$	$(8,99 \pm 0,55) \times 10^8$
	3	1,8	6,20	$(8,44 \pm 0,30) \times 10^8$	$(8,46 \pm 0,32) \times 10^8$
	6	2,2	6,28	$(8,00 \pm 0,58) \times 10^8$	$(8,01 \pm 0,60) \times 10^8$
Альгінат натрію + хітозан	0	1,5	6,16	$(9,00 \pm 0,40) \times 10^8$	$(9,01 \pm 0,42) \times 10^8$
	3	1,9	6,21	$(8,45 \pm 0,33) \times 10^8$	$(8,44 \pm 0,25) \times 10^8$
	6	2,12	6,29	$(8,03 \pm 0,45) \times 10^8$	$(8,04 \pm 0,52) \times 10^8$
Желатин + каолін 20%	0	1,5	6,14	$(9,01 \pm 0,40) \times 10^8$	$(9,02 \pm 0,38) \times 10^8$
	3	1,7	6,18	$(8,48 \pm 0,36) \times 10^8$	$(8,46 \pm 0,23) \times 10^8$
	6	2	6,27	$(8,06 \pm 0,50) \times 10^8$	$(8,07 \pm 0,57) \times 10^8$

До того ж вченими доведено, що капсули, одержані з желатину, на відміну від альгінатних, мають кращу стійкість в кислих умовах шлунка. З огляду на вищенаведене як носій для іммобілізації рекомендується використовувати желатин, та обов'язково додавати каолін для покращення стабільності порошку мікроорганізмів.

3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

Процес виробництва препарату іммобілізованих бактерій в загальному вигляді включає такі стадії:

- 1 стадія – отримання води очищеної;
- 2 стадія – санітарна підготовка виробництва, підготовка тари;
- 3 стадія – отримання маточної культури;
- 4 стадія – приготування поживного середовища;
- 5 стадія – засівання маточної бактеріальної культури;
- 6 стадія – підготовка носіїв, захисних середовищ і зшиваючої речовини;
- 7 стадія – іммобілізація і ліофілізація бактеріальної культури;
- 8 стадія – приготування препарату у вигляді порошку;
- 9 стадія – капсулювання у гранули;
- 10 стадія – фасування, маркування, упаковка;
- 11 стадія – контроль готової продукції;
- 12 стадія – зберігання.

Загальна схема виробництва препарату іммобілізованих клітин бактерій зображена на рис. 1.

Для отримання маточної культури в асептичних умовах розкривають флакон з ліофілізованою культурою штаму *S.thermophilus* IMV B-7249 і проводять ряд послідовних пасажів в бульйоні MRS. Посіви (в пробірках, флаконах, бутлях) інкубують в термокімнаті при температурі $38\pm 2^{\circ}\text{C}$. Маточну культуру контролюють за показниками на відсутність сторонніх мікроорганізмів і грибів.

Для приготування середовища в реакторі розводять 62 г середовища на 1 літр дистильованої води. Кип'ятять протягом хвилини до повного розчинення. Готове середовище має янтарний колір, злегка опалесціє. Стерилізують 12 хв при 121°C . Середовище MRS контролюють за наступними показниками: рН, рівень кисню, стерильність.



Рис. 1. Технологічна схема виробництва препаратів іммобілізованих клітин бактерій

Для *Lactococcus lactis ssp. lactis* використовували середовище M17, яке доповнювали лактозою до кінцевої концентрації 5 г/л. Основний розчин і розчин глюкози автоклавували окремо.

Після стерилізації середовища за допомогою стерильного шланга перекачують в реактор-культиватор.

Для отримання бактеріальної суспензії бактерій у реактор-культиватор з середовищем з дотриманням вимог асептики здійснюють засівання маточної культури.

Культивування проводять протягом (22 ± 4) год при температурі $(38 \pm 2)^\circ\text{C}$ для *Streptococcus thermophilus* IMV B-7249 і температурі $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ для *Lactococcus lactis ssp. lactis* 5739 з періодичним перемішуванням. Отриману бактеріальну суспензію з реактора вивантажують у стерильні бутлі і зберігають при температурі $(5 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Бактеріальну суспензію контролюють за такими показниками: рН, кількість живих бактерій, відсутність сторонніх мікроорганізмів і грибів.

Далі готують носій, захисні середовища і допоміжні речовини.

Для отримання клітин, іммобілізованих желатином, спочатку тонким шаром розсипають необхідну кількість каоліну (2-3 мм) в касети з нержавіючої сталі і стерилізують в сухожаровій шафі при температурі 180°C протягом 15-20 хв. Після стерилізації каолін зсипають у стерильні ємності і герметизують.

Для приготування захисного середовища необхідну кількість желатину заливають очищеною водою і нагрівають при періодичному перемішуванні до повного розплавлення желатину. Далі фільтрують необхідну кількість розчину желатину. Наливають воду очищену, вносять необхідну кількість цукру-рафінаду, перемішують, кип'ятять, потім додають розчин желатину і кип'ятять 15 хв. Готове середовище фільтрують, розливають по пляшках і стерилізують в автоклаві при температурі 110°C і тиску 0,05 МПа протягом 30-35 хв.

В асептичних умовах в бактеріальну суспензію додають захисне середовище. Суспензію бактерій доводять до гомогенного стану протягом 20 ± 5 хв.

Отриману суспензію розливають у касети, висота шару розливої мікробної суспензії повинна бути не більше 15 мм. Під час розливу бактеріальну суспензію контролюють на відсутність сторонніх мікроорганізмів

і грибів. Касети накривають, поміщають в морозильну камеру і заморожують при температурі мінус $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$ не менше 16 год.

Заморожену бактеріальну суспензію поміщають в сублімаційний апарат і висушують протягом (50 ± 6) год. до залишкового вмісту вологи не більше 3,5%. В асептичних умовах сушу біомасу іммобілізованих бактерій вилучають із касет і обробляють в подрібнювачі.

Подрібнену біомасу завантажують у змішувач, туди ж додають розрахункову кількість каоліну. Отриману суміш перемішують у змішувачі до однорідності протягом (30 ± 10) хв. Отриманий порошок вивантажують у стерильні ємності і зберігають щільно закритими до операції капсулювання в холодильній камері при температурі $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ не більше 15 діб.

Отриманий порошок контролюють за такими показниками: рН, кількість живих бактерій, втрата в масі при висушуванні, відсутність сторонніх мікроорганізмів і грибів.

Проводять капсулювання. Наповнені капсули збирають в ємкості з неіржавіючої сталі. У міру накопичення достатньої кількості капсул, їх піддають поліруванню. В процесі роботи стежать за якістю одержуваних капсул і періодично проводять контроль середньої маси капсул, зовнішнього вигляду капсул (блискуча поверхня, відсутність запиленості і деформацій).

Готові капсули поміщають в контейнери і зберігають при температурі $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ до операції фасування препарату в банки.

Готовий препарат іммобілізованих желатином клітин контролюють у відділі контролю якості підприємства.

Для отримання клітин, іммобілізованих альгінатом, до 10 г концентрованої суспензії клітин молочнокислих бактерій додають 100 мл води очищеної і перемішують на магнітній мішалці до однорідності.

Необхідним етапом є проведення поперечної зшивки альгінової кислоти іонами кальцію. Для іммобілізації клітин шляхом мікрокапсулювання в гель альгінату кальцію використовувалася видозмінена методика Кірстена і Б'юкена. Згідно з цією методикою суспензію клітин змішують з рівним об'ємом 4%

розчину альгілату натрію і дозують за допомогою екструзії через форсунку в 0,2 М розчин кальцію хлориду, який беруть в десятикратному надлишку щодо обсягу суміші. В'язкий розчин альгілату натрію за допомогою шприца капали в розчин зшиваючого агента. Краплі альгілату натрію, потрапляючи в розчин, зберігали сферичну форму і повільно занурювалися на дно ємності. Експериментальним шляхом було виявлено, що оптимальний час витримання альгілатних частинок в розчині зшиваючого агента – кальцію хлориду – становить 12 хвилин.

Після змішування суміш доводять до гомогенного стану, залишають «на дозрівання».

Модифікація мікрокапсул розчином хітозану дозволяє забезпечити захист від агресивних чинників середовища шлунково-кишкового тракту (низьке значення рН середовища, ферменти, жовч). Для модифікації мікрокапсул хітозаном їх витримують протягом години в 0,4% розчині хітозану, потім висушують.

Отриману суспензію розливають в касети. Під час розливу бактеріальну суспензію контролюють на відсутність сторонніх мікроорганізмів і грибів. Касети накривають, поміщають в морозильну камеру і заморожують при температурі мінус (50 ± 5) °С не менше 16 год.

Заморожену бактеріальну суспензію поміщають в сублімаційний апарат і висушують протягом (50 ± 6) год. до залишкового вмісту вологи не більше 3,5%. В асептичних умовах суху біомасу іммобілізованих бактерій вилучають із касет і обробляють в подрібнювачі. Отриманий порошок вивантажують в стерильні ємності і зберігають щільно закритими до операції капсулювання в холодильній камері при температурі (5 ± 3) °С не більше 15 діб.

Отриманий порошок контролюють за такими показниками: рН, кількість живих бактерій, втрата в масі при висушуванні, відсутність сторонніх мікроорганізмів і грибів.

Проводять капсулювання. Наповнені капсули збирають в стерильні ємності. У міру накопичення достатньої кількості капсул, їх піддають

поліруванню. В процесі роботи стежать за якістю одержуваних капсул і періодично проводять контроль середньої маси капсул, зовнішнього вигляду капсул (блискуча поверхня, відсутність запиленості і деформацій).

Готові капсули поміщають в контейнери і зберігають при температурі $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ до операції фасування препарату в банки.

Готовий препарат іммобілізованих альгінатом і модифікованих хітозаном клітин контролюють у відділі контролю якості підприємства.

4. БЕЗПЕКА ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ

Протягом останніх десятиліть багатьма країнами світу було розроблено і впроваджено нормативні акти і положення щодо лабораторного біозахисту, в яких надано рекомендації і правила щодо зберігання, користування мікробіологічними матеріалами і доступу до них з метою їх використання за призначенням. В Україні теж було розроблено такі законодавчі акти, серед яких найважливішими є «Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю ДСП 9.9.5.-080-02», затверджені постановою Головного державного санітарного лікаря України від 28.01.2002 р. № 1, а також Закон України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» від 24.02.1994 № 4004-XII, Наказ МОЗ України «Про режим роботи з патогенними мікроорганізмами» від 14.12.1992 № 183, та інші [27, 28, 29].

В лабораторіях при роботі з пробіотичними мікроорганізмами важливо дотримуватися вимог асептики. Працювати в лабораторії необхідно в халаті, захищаючи одяг і шкіру від попадання і роз'їдання реактивами, а також від обсіменіння мікроорганізмами. Усі роботи проводяться в ламінарному боксі під ламінарним потоком повітря.

Бажано, щоб штами, які використовуються для створення іммобілізованих форм, призначених для застосування у харчовій промисловості, були людського походження. Крім того, очікується, що пробіотичний штам буде функціонувати краще в аналогічному середовищі, з якого він був спочатку ізольований (наприклад, шлунково-кишковий тракт людини).

В мікробіологічній лабораторії обов'язково в полі зору працівників мають знаходитися інструкції з техніки безпеки, затверджені адміністрацією підприємства.

До роботи в мікробіологічній лабораторії допускаються лише особи після проходження медичного огляду, уважного вивчення правил техніки безпеки та проведеного керівником інструктажу.

В лабораторії постійно мають бути наявні засоби особистого захисту (халати, гумові рукавички, захисні окуляри та ін.), а також засоби для надання першої медичної допомоги (медична аптечка), протипожежні засоби (вогнегасник, протипожежний килим, вода).

В лабораторії заборонено вживати їжу, палити. В процесі роботи слідкують за дотриманням гігієнічних умов, систематично миють руки теплою водою з милом, після чого дезінфікують.

Роботи, пов'язані з виділенням газів та випарів, проводять тільки під витяжною шафою. Розчини відбирають лише піпетками, використовуючи дозатори. Забороняється набирати розчини через піпетку ротом.

Для приготування розчинів сипкі речовини відбирають шпателем і переносять в мірні стакани чи колби. Готові реактиви зберігають у герметично закритому посуді з етикетками, на яких вказують формулу або назву речовини, концентрацію та дату виготовлення.

Починаючи роботу з іммобілізації клітин мікроорганізмів, необхідно чітко зрозуміти методику роботи, правила її безпечного виконання, перевірити відповідність взятих речовин потрібним у роботі речовинам.

Студентам забороняється працювати в лабораторії без присутності керівника або лаборанта, а також у невстановлений час без дозволу керівника.

До виконання роботи можна приступити тільки після отримання інструктажу з техніки безпеки і дозволу керівника.

Дослід необхідно проводити в точній відповідності з рекомендаціями та технікою безпеки, суворо дотримуватися черговості додавання реактивів.

Якщо в ході досліду необхідно нагріти реакційну суміш, треба слідувати передбаченим методичним вказівкам зі способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці або на газовому пальнику та ін. Сильно летючі горючі речовини небезпечно нагрівати на відкритому вогні.

Після завершення роботи в лабораторії вимикають від джерела живлення прилади та обладнання, воду та електроенергію. Прибирають робоче місце та приводять в належний стан засоби індивідуального захисту.

При виникненні в лабораторії аварійної ситуації, що створює загрозу біологічній безпеці, необхідно одразу повідомити наукового керівника та робітників лабораторії, відключити від джерела живлення всі електроприлади та обладнання та застосувати необхідні засоби захисту.

Для запобігання службового травматизму та поранень в мікробіологічній лабораторії працівники повинні знати первинні методи медичної допомоги.

Основними заходами з первинної допомоги в лабораторії вважаються такі:

1. При незначних забиттях до постраждалої ділянки прикласти холодний компрес, при порізах відкритих ділянок шкіри не торкатися рани брудними руками та сторонніми предметами, накласти стерильну пов'язку та забинтувати.

2. При порізах та пораненнях склом необхідно акуратно видалити залишки скла з порізу та обробити рану йодом, після чого перев'язати поранене місце бинтом. При роботі в мікробіологічній лабораторії внаслідок необережності можуть статися хімічні і термічні опіки, отруєння випарами різних хімічних реактивів. Для надання першої медичної допомоги постраждалим у кожній лабораторії повинні знаходитися аптечка або такі набори, які включають в себе бинт, гігроскопічну вату, 3%-ний розчин йоду, 2%-ний розчин борної кислоти, 2%-ний розчин оцтової кислоти, 3%-ний розчин NaHCO_3 (питна сода), клей БФ-6.

3. При термічних опіках першого та другого ступеня слід зробити примочки із 2%-ного свіжоприготовленого розчину питної соди NaHCO_3 або 5%-ного розчину KMnO_4 (перманганату калію). Ефективним є застосування 96%-ного етилового спирту, який здійснює знезаражуючу дію. При більш тяжких опіках варто звернутися до лікарні.

4. При хімічних опіках кислотами та лугами вражену ділянку шкіри швидко промивають великою кількістю води, а потім, при опіках кислотою, роблять примочки із 2%-ного розчину NaHCO_3 , а при опіках лугами – 2%-ного розчину CH_3COOH . При потраплянні на шкіру кислот чи лугів, вражені ділянки промити відповідно 1%-ним розчином NaHCO_3 або 1%-ним водним розчином CH_3COOH , а потім змити великою кількістю води. При потраплянні кислоти або лугу на слизові оболонки та органи зору їх слід промити великою кількістю води та звернутися за медичною допомогою. При отруєнні хімічними реактивами слід надати першу медичну допомогу та одразу звернутися до лікарні.

5. При ураженні електричним струмом слід негайно відключити струм, відокремити постраждалого від струмопровідних частин, ізолювавши руки гумовими рукавичками. Потерпілому треба розстібнути одяг, створити доступ до свіжого повітря, забезпечити цілковитий спокій, слідкувати за пульсом та диханням. У важких випадках зробити штучне дихання та негайно викликати швидку допомогу.

ВИСНОВКИ

1. Обробка альгінатних капсул 0,5% розчином хітозану забезпечує поліпшення стабільності мікрокапсул, покращення їх міцності.

2. Введення каоліну зумовлює зниження гігроскопічності, поліпшення технологічних параметри порошку, необхідних для його оптимального дозування в желатинові капсули, і стабільність в процесі зберігання.

3. Капсули, що містять в якості сорбенту альгінат натрію, мають більш низькі показники об'ємної щільності. Модифікація поверхні хітозаном призводила до зниження об'ємної щільності гранулятів в межах 4,7-4,8%. У випадку желатинових мікрокапсул з каоліном отримали кращі показники об'ємної щільності, яка склала 1120 кг/м³.

4. Використовувати метод прямого пресування для отримання таблеток недоцільно. Оптимальним є варіант використання досліджуваних гранул як самостійно використовуваної форми у вигляді порошку.

5. В результаті проведеної оцінки біологічної активності і зберігання препаратів на основі іммобілізованих бактерій підтверджено стабільність мікрокапсул протягом терміну їхнього зберігання. В усіх зразках мікрокапсул кількість життєздатних бактерій *Streptococcus thermophilus* і *Lactococcus lactis* становила не менше 8×10^8 КУО/г до кінця терміну спостереження. Втрати маси при висушуванні та рН знаходилися в допустимих межах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Асташкина А. П. Современные взгляды на биологическую роль бифидо- и лактобактерий / А. П. Асташкина // Вестн. ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2010. – № 1. – С. 133–139.
2. Байбаков В. И. Новый кислотоустойчивый штамм *B. bifidum* 791 БАГ как основа БАД и заквасок / В. И. Байбаков, А. В. Молокеев, Л. Т. Карих // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга : материалы 13-го Междунар. Славяно-Балтийского науч. форума «Санкт-Петербург – Гастро-2007». – 2007. – № 1–2. – С. А21.
3. Бактерії роду *Lactobacillus* у харчовій промисловості (огляд) / Волосянко О. В., Ушкалов В. О., Терещенко С. А., Жукова О. В., Марущак Л. В. // Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. Наукові доповіді НУБіП України. 2018. № 6 (76). С. 125-130.
4. Блат С. Ф. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / С. Ф. Блат, И. А. Хавкин // Рос. вест. перинатологии и педиатрии. – 2011. – Т. 56, № 1. – С. 159–174.
5. Васильєва К.О., Волошина І.М. Біотехнологічні аспекти *Bifidobacterium* // Збірник тез Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія» (м. Київ, 14-15 травня 2020 р.). – С. 62.
6. Верниковский В. В. Изучение технологических свойств гранул поперечношпигитого альгината, используемых в качестве носителя иммобилизованных клеток / Верниковский В.В., Корочинский А.В., Степанова Э.Ф. // Вестн. новых мед. технологий: Клеточные технологии. 2009. –Т. 16, №4. – С. 93-95.
7. Вобликова Т. В. Жизнеспособность иммобилизованной микрокапсулированием культуры *Bifidobacterium bifidum* в кисломолочном напитке и смоделированных желудочно-кишечных

- жидкостях. Вестник МГТУ. 2019. Т. 22, № 3. С. 305-313.
8. Воеводина, Ю. А. Оценка биологических свойств новых штаммов пробиотических микроорганизмов / Ю. А. Воеводина, С. В. Шестакова, Е. Н. Закрепина // Вестн. Бурят. гос. сельскохозяйств. акад им. В. Р. Филиппова. – 2016. – № 1 (42). – С. 59–63.
 9. Воловик, Т. Н. Оптимизация параметров процесса инкапсулирования пробиотических культур / Т. Н. Воловик, Л. В. Капрельянц // Пищевая наука и технология. – 2014. – Т. 28, № 3. – С. 19–22.
 10. Ганина В.И. Микрокапсулирование как способ защиты пробиотических культур от неблагоприятных условий / В. И. Ганина, Н.В. Ананьева, Л.В. Калинина // Перспективы производства продуктов питания нового поколения. Сб. ст. 2 междунар. науч.-практич. конф. – Омск, 2005. – С. 100-102.
 11. Глушанова, Н. А. Биологические свойства лактобацилл / Н. А. Глушанова // Бюл. сиб. медицины. – 2003.– № 4 – С. 50-58.
 12. Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа: / МЗ СССР, 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987- 1992.- в 2-х вып.
 13. Демаков, В.А. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты / Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. // Биотехнология. – 2008. - № 2 – С.30-45.
 14. Дисбиоз кишечника и принципы его коррекции / А. И. Дядык [и др.] // Новости медицины и фармации. – 2012. – № 419. – С. 50–60.
 15. Езерский М.Л. Влияние размера и формы частиц на сыпучесть и насыпную массу/ Езерский М.Л., Трахман Ю.Г., Солодовник Т.Г. // Всесоюз. съезд фармацевтов, (3; 1980; Кишинёв): тез. докл. 3 Всесоюзн. съезда фармацевтов – Кишинёв, 1980. – С. 98.
 16. Езерский, М. Л. Методы определения технологических характеристик фармацевтических порошков. Насыпной вес, объемная плотность, сыпучесть, угол откоса, слипаемость, сопротивление сдвигу / М.Л. Езерский // Хим.- фармац. журн. - 1977. - №8. - С. 98-114.

17. Ермоленко, Е. И. Антимикробное действие лактобацилл / Е. И. Ермоленко, О. В. Рыбальченко // Медицина. XXI век. – 2007. – № 5 (6). – С. 41–48.
18. Жантлесова С.Д. Иммобилизация клеток пробиотических микроорганизмов для разработки функциональных продуктов питания // МНИЖ. 2021. №3-2 (105).
19. Значение лактобактерий в организме человека и тактика правильного выбора эубиотика / И. Б. Ершова, Л. И. Гаврыш, Е. Н. Кунегина, А. А. Мочалова // Здоровье ребенка. – 2008. – № 1(10). – С. 51–54.
20. Зрячкин, Н.И. Новый подход к классификации пребиотиков, пробиотиков и синбиотиков /Зрячкин Н.И. // Фарматека. 2007. - №2. С.58.
21. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы: пер. с англ. / Под ред. Дж. Вудворда.– М.: Мир, 1988. – 215 с
22. Копанев Ю.А. Особенности применения хилака форте при функциональных расстройствах желудочно-кишечного тракта, нарушениях биоценоза и других патологических состояниях / Копанев Ю.А. // Фарматека. -2008. - №14. - С. 57-61.
23. Маевская, М.В. Пробиотики и пробиотические продукты в практике врача-гастроэнтеролога / Маевская М.В. // Фарматека – 2010. - №2. – С. 72-77.
24. Мазанкова, Л.Н. Пробиотики на современном этапе – клинические подходы и области применения. Пособие для врачей / Мазанкова Л.Н., Шевелева С.А., Лыкова Е.А. - М., 2005. - 40с.
25. Николаева, Т. Н. Иммуностимулирующая и антиканцерогенная активность нормальной лактофлоры кишечника / Т. Н. Николаева, В. В. Зорина, В. М. Бондаренко // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2004. – № 4. – С. 39–43.
26. Новик Г. И. Бифидобактерии: научные основы практического использования / Г. И. Новик // Пробл. здоровья и экологии. – 2006. – № 3 (9). – С. 144–151.

27. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю ДСП 9.9.5.-080-02 [Електронний ресурс] : Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи 28.01.2002. Затверджено постановою Головного державного санітарного лікаря України від 28.01.2002 р. № 1. . – Електрон. текст. дан. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0001588-02>. – Дата останнього доступу: 11.06.2021.
28. Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення (Із змінами) [Електронний ресурс] : закон України від 24.02.1994 № 4004-ХІІ; станом на 14.01.2021. – Електрон. текст. дан. – Режим доступу : <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/4004-12>. – Дата останнього доступу : 12.06.2021.
29. Про режим роботи з патогенними мікроорганізмами (Із змінами) [Електронний ресурс] : Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 14.12.1992 № 183; станом на 03.08.1999. – Електрон. текст. дан. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0183282-92>. – Дата останнього доступу: 12.06.2021.
30. Протимікробна активність продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* відносно тест-культур стафілококів і коринебактерій / О. Ю. Ісаєнко, О. В. Книш, Є. М. Бабич, С. В. Зачепило, О. М. Савінова, О. А. Набойченко // Фармакологія та лікарська токсикологія. - 2017. - № 3. - С. 50-55. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/flt_2017_3_7.
31. Рябцева С. А., Сазанова С. Н., Дубинина А.А. *Saccharomyces boulardii* как потенциальные пробиотики для инновационных пищевых продуктов// Современная наука и инновации. – 2019. -№2 (26). – С.138-151.
32. Старовойтова С. О. Сучасні аспекти технології іммобілізованих пробіотиків / *Biotechnology*. - 2012. - Vol. 5, № 4. - С. 9-20. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2012_5_4_3.
33. Ушкалова, Е. «Живое» лекарство: Линекс/ Ушкалова Е. // Врач - 2007. - Спец. вып.- С. 31-35.

34. Хорошилова, Н.В. Терапевтическая эффективность пробиотиков / Н.В. Хорошилова / Новая аптека. Аптечный ассортимент – 2009. - №6. – С. 100-102.
35. Шевцова, Д. Обґрунтування вибору біополімерів для оболонки мікрокапсули / Д. Шевцова, В. Подрушняк, Г. Коркач // Матеріали 85-ї Ювіл. Міжнар. наук. конф. молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», присвяч. 135-річчю Нац. ун-ту харч. технологій, Київ, 11–12 квіт. 2019 р. – Київ, 2019. – Ч. 1. – С. 172.
36. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3 : Пробиотики и функциональное питание / Б. А. Шендеров. – Москва : Гранд, 2001. – 287 с.
37. Anil, K.A. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery / A.K. Anil, H. Singh. // Singh Trends in Food Science & Technology. – 2007. – №18. – P. 240-251.
38. Coghetto C. C., Vasconcelos C. B., Brinques G. B., Ayub M. A. Z. Lactobacillus plantarum BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue // Brazilian Journal of Microbiology. 2016. Vol. 47, Iss. 4. P. 941–948.
39. Cousin F.J. Mater D.D., Foligne B., Jan G. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence // Dairy science & technology. – 2011. – Vol. 91. – № 1. – P. 1–26.
40. Czerucka D., Rampal P. Diversity of Saccharomyces boulardii CNCMI-745 mechanisms of action against intestinal infections // World J Gastroenterol 2019 May 14; 25(18): 2188-2203; DOI: 10.3748/wjg.v25.i18.2188.
41. Doleyres, Y. Paquin Bifidobacterium longum ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium / Doleyres, Y. Paquin, C. LeRoy, M. and Lacroix, C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2002. – Vol. 60. - P. 168-173.
42. Falentin H., Deutsch S., Jan G., Loux V., Thierry A., Parayre S. The complete

- genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. *PloS One*. – 2010. – Vol. 5. – P. 11748–11753.
43. Gauri A., Shiwangi M. Immobilization and microencapsulation. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*. 2017. 2(3): 1-4.
44. Hyndman, C.L. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* with cross-link gelatin membranes/ Hyndman C.L. [et al.] // *J. Chemical Technol. Biotechnol.* - 1993. - Vol. 56. – P. 259-263.
45. Jankowski, T. Encapsulation of lactic and bacteria with alginate /starch capsules/ Jankowski T., Zielinska M. // *Biotechnol Technol.* – 1997. – Vol. 11. – P. 31-34.
46. Kearney, L. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium-alginate beads incorporating cryoprotectants / Kearney L., Upton M., Loughlin A. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. - Vol. 56. – P. 3112-3116.
47. Klinkenberg G., Lystad K.Q., Levine D.W., Dyrset N., Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in Chitosan and Alginate Coated Beads//*Journal of Dairy Science*, Vol. 84(5), 2001, p. 1118-1127.
48. Mallon P, McKay D, Kirk S, Gardiner K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD005573.
49. Mortazavian, A. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms/ Mortazavian A., Razavi S.H., Ehsani M.R., Sohrabvandi S // *Iranian J. of Biotechnology*. – 2007. - Vol. 5. – P. 3-22.
50. Szajewska H, Skórka A, Dylag M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:257–64..
51. Tong JL, Ran ZH, Shen J, Zhang CX, Xiao SD. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: P. 155–68.