



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до виконання лабораторних робіт
з курсу

«Біотехнологія фармакологічно активних інгредієнтів»

для студентів спеціальності
162 «Біотехнології та біоінженерія»

Затверджено
редакційно-видавничою
радою університету,
протокол № 3 від 06.10.2021 р.

Харків
НТУ «ХПІ»
2021

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Біотехнологія фармакологічно активних інгредієнтів» для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : НТУ «ХПІ». – 49 с.

Укладачі Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко

Рецензент Л. В. Кричковська

Кафедра біотехнології, біофізики та аналітичної хімії

ВСТУП

Фармацевтична біотехнологія є пріоритетним напрямком розвитку сучасної фармації. Сьогодні у арсеналі фахівця-біотехнолога знаходиться великий набір технологічних, фізико-хімічних, мікробіологічних, імунологічних, фармакологічних методів.

Метою даного видання є поглиблення теоретичних знань та формування практичних навичок біотехнологічного одержання препаратів різних фармацевтичних груп та їх контролю. В методичних вказівках наведено накопичений досвід розробки і впровадження біотехнологічних препаратів, одержаний на кафедрі біотехнології, біофізики та аналітичної хімії протягом багатьох років.

Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, здобувач має можливість ознайомитися з теоретичними питаннями та основними новими термінами, а також поглибити свої знання, скориставшись рекомендованою літературою.

У цих методичних вказівках запропоновані чотири лабораторні роботи: «Приготування та контроль якості поживних середовищ для вирощування штамів пробіотиків»; «Вирощування штамів мікроорганізмів (пробіотиків) та контроль отриманих продуктів»; «Виділення ферменту гіалуронідази і визначення її біологічної активності»; «Виділення пектинових речовин із рослинного матеріалу та їх дослідження». Запропоновані лабораторні роботи передбачають опанування здобувачами широкого спектру технологічних та аналітичних методик: культивування, осадження, фільтрування, потенціометрія титриметричний та колориметричний аналіз та ін.

Кожна лабораторна робота містить контрольні запитання, що дозволяє систематизувати набуті знання та навички.

Лабораторна робота 1. ПРИГОТУВАННЯ ТА КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ШТАМІВ ПРОБІОТИКІВ

Мета роботи – оволодіти методиками приготування та контролю поживних середовищ.

Основні завдання:

1. Оволодіти методиками виготовлення і контролю поживних середовищ
2. Визначити вміст амінного азоту у поживному середовищі.

Таблиця 1.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2
Обладнання та матеріали	1. Ваги аналітичні	+	+
	2. Плитка електрична	+	
	3. Мішалки електричні	+	
	4. Шафа сушильний (50-200 °C)	+	
	5. Холодильник 4-8 °C	+	
	6. рН-метр	+	+
	7. Воронка Бюхнера	+	
	8. Колба Бунзена	+	
	9. Піпетки 5 мл, 10 мл	+	+
	10. Циліндри мірні	+	+
	11. Папір фільтрувальний	+	+
	12. Автоклав паровий	+	
	13. Пробірки скляні 20 і 50 мл	+	
	14. Склянки скляні, 50 мл		+
	15. Колби об'ємом 50 мл, 100 мл		+
Сировина	1. Печінка яловича	+	
	2. Дріжджі або автолізат дріжджів (комерційний)	+	
	3. Казеїн або ферментативний гідролізат казеїну (комерційний)	+	
	4. Пептон	+	
	5. Агар-агар	+	

Закінчення таблиця 1.1

Сировина	6. Яловича підшлункова залоза	+	
Реактиви	1. Натрію хлорид, Р	+	
	2. Лактоза, Р	+	
	3. Марганця сульфат, Р	+	
	4. Магнію сульфат, Р	+	
	5. L-цистин, Р 10	+	
	6. Калію дигідрофосфат, Р	+	
	7. Глюкоза, Р	+	
	8. Пептон сухий ГОСТ 13805-76	+	
	9. ТВИН-80, Р	+	
	10. Амонію цитрат, Р	+	
	11. Натрію ацетат, Р	+	
	12. Гідролізований молоко по Богданову (500 мл)	+	
	13. Кислота хлористоводнева, Р	+	
	14. Вода очищена, Р	+	
	15. Розчин натрію гідроксиду 0,1моль/л, Р		+
	16. Розчин хлоридної кислоти 0,1моль/л, Р		+
	17. Формалін нейтральний, Р		+
	18. Розчин натрію гідроксиду 10 %, Р		+



ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Для нормального росту і розвитку мікроорганізмів, як і будь-яким живим істотам, потрібні органічні і неорганічні субстрати, які надають їм енергію та матеріал для біосинтезу. У природних умовах всі необхідні елементи для харчування мікроорганізми отримують з навколишнього середовища. При культивуванні в лабораторних умовах використовують поживні середовища, в яких харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються штучно. Клітини мікроорганізмів потребують для свого розвитку макроелементи (вуглець, азот, водень, кисень, фосфор та ін.) та мікроелементи (цинк, марганець, йод, мідь тощо). Для деяких мікроорганізмів додатково необхідні фактори росту (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти) і вітаміни. Отже, поживні середовища містять збалансований набір органічних та неорганічних речовин і є придатними для росту і розвитку мікроорганізмів.

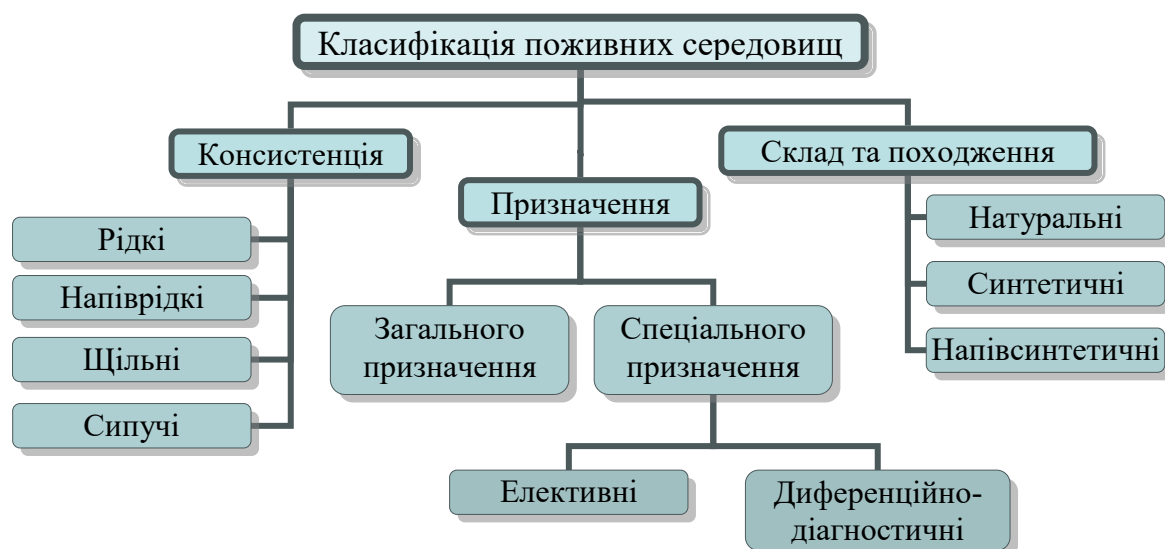


Рисунок 1.1 – Класифікація поживних середовищ

Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси або метаболітів мікроорганізмів, для визначення їх фізіолого-біохімічних особливостей тощо.

Напіврідкі середовища містять 0,75–1% агар-агару або 5–7,5% желатину і використовуються для визначення газоутворення та характеру росту мікроорганізмів.

Щільні середовища містять 1,5–2% агар-агару або 10–15% желатину. Вони використовуються для виділення чистих культур мікроорганізмів, вивчення їх культуральних особливостей та антагоністичних властивостей.

Сипучі середовища (розварене зерно, а також сипучі субстрати, просочені поживними речовинами) використовуються, як правило, в промисловості.

Натуральні середовища мають рослинне або тваринне походження та невизначений склад. Це відвари злаків, фруктів та овочів; молоко, кров, сироватка, сеча, тваринні тканини, яйця птахів та їх зародки; дріжджовий автолізат; відвари м'яса; витяжки гною і ґрунту; вода озер і морів. До них належить м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонна желатина та ін.

Синтетичні середовища готуються з певних хімічно чистих речовин у точно вказаних концентраціях. Вони мають визначений склад і легко відтворюються.

Напівсинтетичні середовища мають частково невизначений склад. Вони містять як хімічно чисті сполуки (вуглеводи, фосфати, нітрати), так і компо-

ненти з не встановленим чітко складом (дріжджовий екстракт, пивне сусло, пептон).

Середовища загально призначення використовують для культивування більшості відомих мікроорганізмів. Наприклад, МПБ, МПА, МПЖ.

Середовища спеціального призначення готують з певною метою для конкретних потреб. Серед них розрізняють *елективні*, або *селективні середовища*, які забезпечують оптимальні умови лише для певних мікроорганізмів (наприклад, середовище Ешбі для азотфіксаторів); та *диференційно-діагностичні середовища*, які використовують для ідентифікації мікроорганізмів (наприклад, середовище з желатиною для виявлення желатинази, середовище з кров'ю для визначення гемолітичної активності, середовище Ендо для виявлення кишкової палички).

Найважливіші хімічні елементи (вуглець, азот, фосфор та сірку) мікроорганізми споживають у різних формах. Джерелами вуглецю можуть бути органічні речовини – цукри, спирти, органічні кислоти, амінокислоти та неорганічні – карбонати, діоксид та монооксид вуглецю.

Джерелами азоту можуть бути неорганічні сполуки (амонійні солі, нітрати, молекулярний азот) та неорганічні (амінокислоти). Найдоступнішим джерелом азоту для мікроорганізмів є амонійний азот, який має ступінь окислення (N^{3-}), бо саме в такому вигляді він включається в процес біосинтезу амінокислот. Для включення нітратного азоту в біосинтез мікроорганізмам потрібно спочатку його відновити з N^{5+} до N^{3-} . Цей процес називається асиміляторною нітратредукцією і потребує затрат енергії. Зв'язування молекулярного азоту називається азотфіксацією і є ще більш енергозатратним, тому азотфіксація притаманна лише певним мікроорганізмам. Деякі мікроорганізми використовують як джерело азоту амінокислоти, які одночасно можуть бути і джерелом вуглецю.

Універсальним джерелом фосфору для мікроорганізмів є фосфатні солі.

Джерелом сірки для більшості мікроорганізмів є сульфати. Для включення сульфатної сірки в біосинтез, її спочатку необхідно відновити з S^{6+} до S^{2-} . Цей процес називається асиміляторною сульфатредукцією і потребує енергетичних затрат.

Речовини, що поглинаються мікроорганізмами, мають забезпечити їх енергією, необхідною для активного біосинтезу, відновленими еквівалентами (тобто електронами), які потрібні для функціонування дихального ланцюга, фотосинтетичних електронтранспортних систем та процесів анаболізму, та вугле-

цем, який є основним клітинним компонентом. За джерелом енергії мікроорганізми поділяють на хемо- та фототрофів. Хемотрофи одержують енергію за рахунок хімічних реакцій, а фототрофи – у результаті перетворення енергії світла.

За походженням джерела електронів мікроорганізми поділяють на органі- та літотрофів. Органотрофи одержують електрони в процесі окислення органічних сполук, а літотрофи – неорганічних. За походженням джерела вуглецю мікроорганізми поділяють на авто- та гетеротрофів. Автотрофи споживають неорганічні джерела вуглецю, а гетеротрофи – органічні.

Поживні середовища мають відповідати таким вимогам:

- ✓ містити всі необхідні джерела макро- та мікроелементів, а за необхідності – вітаміни і фактори росту;
- ✓ усі сполуки, які входять до їх складу, мають бути у певному збалансованому співвідношенні;
- ✓ містити у своєму складі необхідну кількість води;
- ✓ мати оптимальні для мікроорганізмів значення рН;
- ✓ бути ізотонічними, тобто мати такий самий осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини;
- ✓ бути стерильними.

Мета процесу стерилізації полягає в повному знищенні всіх живих мікроорганізмів і спор у середині або на поверхні об'єкта. Стерилізують поживні середовища, лабораторний посуд, інструменти, розчини і т.д.

Стерилізація (від латин. *sterilis* – безплідний, тобто «стерилізація» – знепліднення) – це знищення мікроорганізмів у різних об'єктах шляхом дії на них чинниками, згубними для мікрорганізмів. Всі засоби стерилізації розділяють на фізичні та хімічні; або на термічні та холодні. Вибір відповідного засобу залежить від властивостей об'єкту стерилізації.

Термічна стерилізація базується на знищенні мікрорганізмів за допомогою високих температур. Термічна стерилізація легко здійснюється і найчастіше використовується в практичній діяльності людини та мікробіологічній практиці. При цьому потрібно пам'ятати, що у вегетативних (неспорових) клітинах денатурація білків і загибель починається вже при температурі 56–60 °С. Більш термостійкі спори гинуть у сухій атмосфері при температурі 160 °С протягом 1–2 год, а у вологому середовищі загибель спор відбувається при температурі 112–120 °С протягом 20–30 хв.

Низькі температури не вбивають, а лише затримують розвиток мікроорганізмів. ***Холодні методи стерилізації*** включають різноманітні методи зни-

щення мікроорганізмів. Називають їх холодними умовно, щоб підкреслити, що вони не пов'язані з дією високих температур. До цих засобів відносять хімічну стерилізацію або дезінфекцію, різні фізичні методи стерилізації (окрім використання температурного фактору) та механічне звільнення від мікроорганізмів (стерилізуюча фільтрація).

До методів термічної стерилізації належать: 1) кип'ятіння, 2) стерилізація сухим жаром, 3) стерилізація текучою парою, 4) стерилізація парою під тиском, 5) пастеризація, 6) дробна стерилізація та тиндалізація.

Кип'ятіння є одним з найпростіших способів стерилізації. Проводиться у стерилізаторі – металевій прямокутній коробці з кришкою і сіткою на дні для розташування предметів, що стерилізуються. У нього наливають воду та нагрівають до кипіння. Кип'ятіння триває від 15–30 хв до 2 год при температурі близько 100 °С. Кип'ятінням стерилізують дрібні металеві або скляні предмети – шприци, голки, скляні трубки та ін. При цьому гинуть вегетативні форми мікроорганізмів і частина спор. Кип'ятінням у дистилаті стерилізують мембранні фільтри. Режим стерилізації для мембранних фільтрів – 30–60 хв. з моменту енергійного закипання води. У мікробіологічній практиці таким способом стерилізації користуються рідко у зв'язку з тим, що тривале кип'ятіння може пошкодити оброблюваний матеріал, а скорочення часу кип'ятіння може не забезпечити стерильності.

Стерилізація сухим жаром. Проводиться гарячим повітрям у печі Пастера або сушильній шафі. Стерилізація проводиться при температурі 160–170 °С протягом 1,5–2 год. Стерилізують сухим жаром переважно скляний посуд – чашки Петрі, піпетки, шпателі, пробірки, колби. Цей метод надійний – гинуть спорові і неспорові форми мікроорганізмів. Обернутий у папір простерилізований посуд можна зберігати.

Стерилізація текучою парою. Проводиться гарячим вологим повітрям в апараті Коха.

У нижню частину металевого циліндру наливають воду, над нею розташовують полицю з отворами і матеріал, що стерилізується. Апарат щільно закривають конічною кришкою з отвором для виходу пари і нагрівають на вогні. Коли вода закипить, гаряча водяна пара з температурою близько 100 °С «потече» сильним струменем з отвору кришки. З цієї миті відраховують час початка стерилізації. Стерилізація текучою парою триває від 45 хв до 1,5 год залежно від об'єму матеріалу, що стерилізується. В такий спосіб стерилізують поживні середовища, які не можна нагрівати вище 100 °С, наприклад м'ясо-пептонний

желатин (при температурі вище 100 °С він розріджується та не застигає). Цей засіб стерилізації не достатньо надійний – повністю гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори зберігаються. Для досягнення повної стерилізації середовища в апараті Коха застосовують *дрібну стерилізацію*.

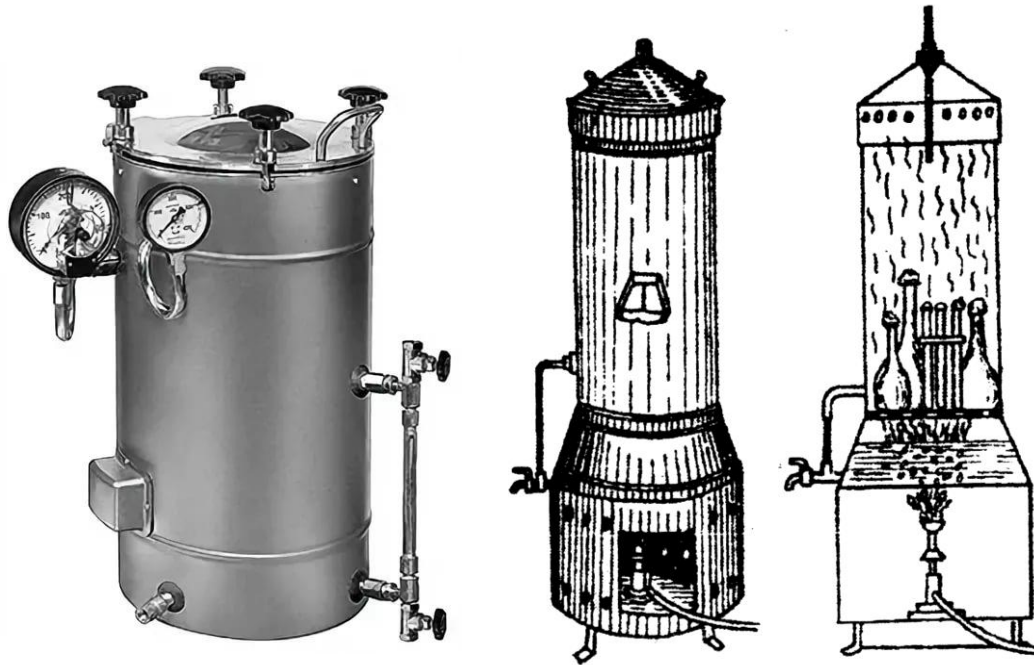


Рисунок 1.2 – Апарат Коха

Стерилізація парою під тиском. Проводиться насиченою водяною парою в автоклаві. Автоклави бувають різної конструкції, але засновані на одному принципі. Це металева двостінна ємність, здатна витримувати високий тиск. Внутрішня частина – стерилізаційна камера, в яку поміщають матеріал, що стерилізується. Вона оточена водопаровою камерою, яка має кран для виходу повітря і пари. При стерилізації у водопарову камеру наливають воду до необхідного рівня. Предмети у камері слід розміщувати не дуже щільно, оскільки пара повинна вільно проходити між ними. Кришка автоклава герметично закривається. Після закінчення часу стерилізації нагрівання припиняють, відкривають паровий клапан і спускають пару.

Стерилізують парою під тиском поживні середовища, скляний посуд, інструменти й ін. Автоклавування є швидким і надійним способом стерилізації, при якому гинуть всі форми мікроорганізмів, навіть найстійкіші спори.

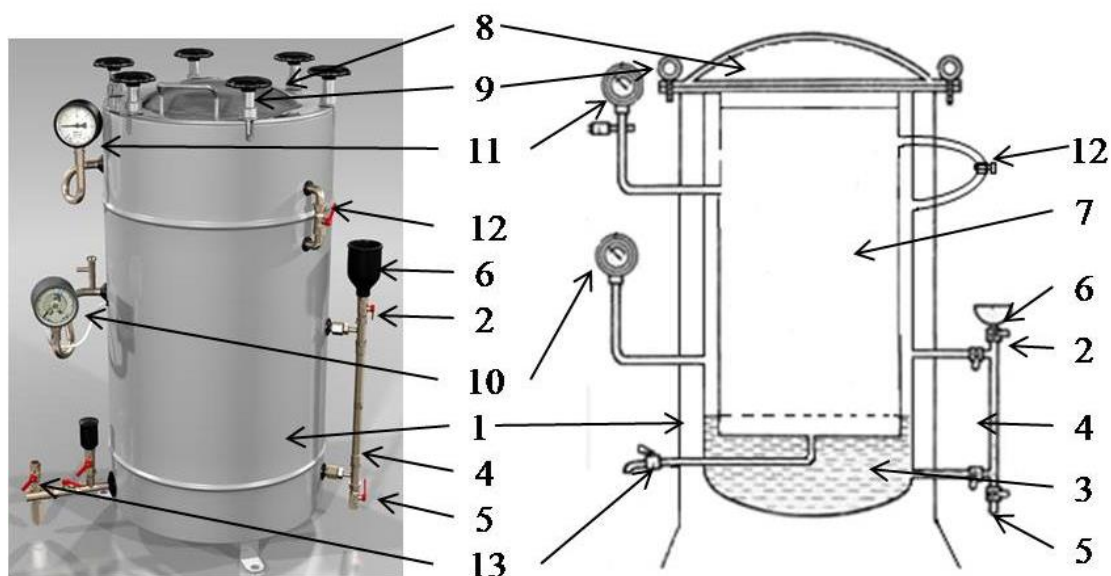


Рисунок 1.3 – Автоклав: 1 – кожух, 2 – вентиль для заповнення автоклава водою, 3 – камера водопарова, 4 – колонка водовказівна для заповнення автоклава водою, 5 – вентиль для зливу води з автоклава, 6 – воронка для заповнення автоклава водою, 7 – камера стерилізаційна, 8 – кришка, 9 – притиск, 10 – манометр електроконтактний (вимірює тиск у водопаровій камері), 11 – манометр (вимірює тиск в стерилізаційній камері), 12 – вентиль для надходження пари в стерилізаційну камеру, 13 – вентиль для видалення пари з стерилізаційної камери.

Пастеризація. Цей спосіб часткової стерилізації названий на честь французького вченого Л. Пастера. Він полягає в тому, що рідину, налиту в стерильний посуд, прогривають на водяній бані при температурі 60–90 °C протягом 10–30 хв. Застосовують пастеризацію для середовищ, які змінюють свої фізико-хімічні властивості при високих температурах. Пастеризовані продукти тривалому зберіганню не підлягають, оскільки при цьому методі стерилізації гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори залишаються. У лабораторній практиці в такий спосіб відокремлюють види мікроорганізмів, що утворюють спори від тих, що не утворюють. У лабораторних умовах пастеризацію проводять або на водяній бані, або в термостаті при наступних режимах: 60–70 °C протягом 30 хв; 80 °C протягом 10–15 хв.

Дробна стерилізація, або тиндалізація використовується для стерилізації поживних середовищ і розчинів, які псуються при використанні температур вище 100 °C. Матеріал стерилізується в декілька прийомів. Дробним може бути кип'ятіння або стерилізація текучою парою в апараті Коха. Метод розроблений Дж.Тиндалем. Матеріал стерилізують при 100 ± 2 °C протягом 10 хв. За цей час усі вегетативні клітини гинуть, життєздатними залишаються тільки спори. По-

тім рідину охолоджують до температури, оптимальної для проростання спор (30 °C), і через декілька годин знову пропускають пару. Двох–трьох подібних циклів зазвичай буває достатньо для знищення всіх спор. Тиндалізацію зазвичай проводять 3 дні по 30 хв щодня, а в перервах залишають матеріал при кімнатній температурі. Це робиться для провокування зростання спор у вегетативні форми і їх знищення при подальших обробках, що підвищує надійність цих засобів.

Інший різновид дробної стерилізації – *дробна пастеризація* – проводиться у водяній бані при температурі 56–58 °C протягом 1 год з 5–6-кратним повторенням через 24 год. В інтервалах між прогріваннями матеріал витримується при кімнатній температурі. Так стерилізують поживні середовища бідні мікроорганізмами, а також середовища, що містять речовини, які легко руйнуються і денатурують при температурі вище 60 °C (білки, вітаміни).

При *холодній стерилізації* використовують хімічні речовини або діють на об'єкт чинниками фізичної природи.

Хімічні методи припинення життєдіяльності мікроорганізмів базуються на використанні дезінфектантів і антисептиків, що мають неспецифічний ефект, або використанні антибіотиків і синтетичних антимікробних препаратів з вибірковою протимікробною дією. Загибель мікроорганізмів при дезінфекції відбувається здебільшого в результаті гідролізу компонентів клітин, коагуляції білків, інактивації клітинних ферментів. Метод хімічної стерилізації застосовують при дезінфекції рук, робочого столу, відпрацьованих скелець і т. д. До антисептиків або дезінфікуючих засобів належать мило, деякі органічні барвники, солі важких металів, окисники (хлор, йод, перекис водню, перманганат калію), формалін, спирти (60–70 %-кові водні розчини), кислоти, антибіотики, газоподібні речовини (формальдегід, окис етилену, озон) і ін. Стійкість мікроорганізмів до їх дії може суттєво змінюватися залежно від таких факторів як концентрація активного компоненту, тривалість контакту, рН, температура, вологість.

Фізичні методи стерилізації: стерилізація ультрафіолетовими променями, радіоактивним випромінюванням, ультразвуком, струмом ультрависокої частоти і ін. Ці методи широко використовують в медицині. Стерилізація з використанням опромінення придатна для термолабільних матеріалів.

Ультрафіолетові промені використовуються для стерилізації центрифужних пробірок, наконечників для піпеток та ін. виробів з термолабільної пластмаси. Час опромінення визначається потужністю лампи, часом дії, кількістю і видовим складом мікроорганізмів забрудненого матеріалу. Вегетативні форми

чутливіші до опромінення, ніж спори, які в 3–10 разів більш стійкіші. Від УФ-випромінювання мікроорганізми можуть бути захищені органічними речовинами, пилом або іншими захисними оболонками. Обмеженням при використанні даного методу стерилізації є низька проникна здатність УФ-променів і висока поглинальна здатність води і скла. Для знезараження повітря використовують бактерицидні лампи. Зважаючи на можливу несприятливу дію ультрафіолетових променів на організм людини бактерицидні лампи включають лише за відсутності людей у приміщенні.

Рентгенівське і γ -опромінювання також ефективно для стерилізації пластмас, харчових продуктів, але вимагає суворого дотримання правил безпеки. Найбільш чутливі до γ -опромінення вегетативні клітини бактерій, потім йдуть цвілеві гриби, дріжджі, бактерійні спори і віруси. γ -Опромінення використовується для стерилізації лікарняного приладдя, антибіотиків, вітамінів, гормонів, стероїдів, пластмасового разового устаткування, шовного і перев'язувального матеріалу.

Механічний метод стерилізації, або стерилізація фільтруванням застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання і дії хімічних речовин (білки, сироватки, антибіотики, вітаміни, леткі речовини і ін.). Метод полягає у пропусканні рідин і газів через спеціальні дрібнопористі фільтри (бактерійні), діаметр пор яких не перевищує 0,45–0,2 мкм. Фільтри затримують мікроорганізми.

Для пропускання розчину через фільтр потрібний вакуум або тиск. Існують два основні типи фільтрів – глибинні і мембранні. Глибинні складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані, звиті або зв'язані в лабіринт проточних каналів. Частки затримуються в них у результаті адсорбції і механічного захоплення в матриксі фільтра. Мембранні фільтри мають безперервну структуру і захоплення ними часток визначається розміром пір.

Для **культивування штамів пробіотиків** використовуються різні поживні середовища, до конструювання яких висувають такі вимоги:

- ✓ попередній вибір поживних субстратів із урахуванням критеріїв біологічної цінності, доступності та економічності;
- ✓ балансування поживних середовищ;
- ✓ отримання поживних основ і оцінка їхньої ефективності на моделі регламентованих поживних середовищ;
- ✓ розробка і оцінка способу отримання поживних основ з урахуванням критерію технологічності та трудомісткості.

Збалансований склад поживних середовищ гарантує необхідний ріст мікроорганізмів, стандартність і стабільність складів, відсутність в готовому препараті різних алергенів. Стерильне поживне середовище, що використовується, містить воду, джерела азоту, вуглеводи, солі мікроелементи, необхідні для росту. Наприклад, лактобацили і біфідобактерії з точки зору потреб харчування для росту і продуктивності мають тенденцію до ауксотрофів по відношенню до деяких з 20 амінокислот і мають потребу в допоміжних речовинах, які необхідно вводити в поживне середовище. Складність цих ауксотрофів і споживання у середовищі поживних речовин часто пов'язана із середовищем, до якого штам було адаптовано і з якого його було отримано. Так, наприклад, *L. plantarum*, отриманий із рослинного матеріалу, має меншу кількість ауксотрофій і більшу біосинтетичну самодостатність у порівнянні з *L. johnsonii*, виділеним з верхньо-шлункового тракту людини, який є середовищем з більшою доступністю клітинних речовин, таких, як вільні амінокислоти, короткі пептиди і олігосахариди. До складу поживних середовищ входять дріжджові екстракти, дріжджові пептони, ферментативні гідролізати казеїну і молока, а також інші складні джерела азоту.

Поживні середовища готують у відповідності до затвердженої на підприємстві-виробникові нормативної документації.



Завдання 1.

ОВОЛОДІТИ МЕТОДИКАМИ ВИГОТОВЛЕННЯ І КОНТРОЛЮ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ

Хід роботи

1. Приготування поживного середовища Блаурокка.

Для приготування поживного середовища використовують продукт, отриманий шляхом екстракції подрібненої яловичої печінки водою (у співвідношенні 1: 1) з наступним кип'ятінням протягом однієї години і стерилізацією при температурі 120 ± 1 °C протягом 20 хвилин при 0,1 МПа. До екстракту печінки додають пептон (1,0%), натрію хлорид (0,5%), лактозу (1,0%), агар-агар (0,2%), цистеїн (0,01%). Встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації значення рН становило $6,8 \pm 0,3$; кип'ятять, фільтрують і стерилізують при 112 ± 1 °C 30 хвилин (0,05 МПа). Середовище зберігають при температурі 6 ± 2 °C не більше 2-х місяців.

На флакони наклеюють етикетки, де вказано: найменування середовища, кількість і дата приготування. Поживне середовище можна зберігати при температурі 2-8 °C протягом 60 діб.

2. Приготування казеїново-дріжджового поживного середовища.

Вибір казеїново-дріжджового середовища насамперед пов'язаний з тим, що це середовище значною мірою відповідає вимогам масового виробництва за сукупністю біологічних, технологічних і економічних параметрів. Для виготовлення казеїново-дріжджового середовища необхідні ферментативний гідролізат казеїну та автолізат пекарських дріжджів.

Гідролізат казеїну отримують шляхом проведення ферментативного гідролізу казеїну підшлунковою залозою при рН 8,0–8,2 і температурі 58–62 °C протягом 5–7 діб (на 200 г казеїну використовують 1,0 л води і 200 г подрібненої свинної підшлункової залози). Протягом усього зазначеного терміну значення рН підтримується на вказаному рівні. Починаючи з 4-го дня, проводять визначення амінного азоту. Припинення його зростання свідчить про те, що процес гідролізу закінчено. Вміст амінного азоту в гідролізаті казеїну має бути від 450 до 600 мг%. Прозору надосадну рідину відділяють і піддають фільтрації. Гідролізат казеїну піддають стерилізації при температурі 120±1 °C протягом 30 хвилин і тиску 0,11 МПа. Зберігають гідролізат при температурі 2–10 °C.

Приготування автолізата пекарських дріжджів проводять шляхом лізування дріжджових клітин при температурі 56–58 °C протягом 48 годин. До дріжджів додають воду (у співвідношенні 1: 4) і суміш стерилізують при температурі 119–121 °C і тиску 0,11 МПа протягом 30 хвилин. Вміст амінного азоту в автолізаті – 150-180 мг%. Зберігають при температурі 4–10 °C не більше 1,5 місяця.

Приготування казеїново-дріжджового середовища: ферментативний гідролізат казеїну, розведений водою до вмісту амінного азоту 150±10 мг% змішують з дріжджовим автолізатом (співвідношення 1: 2), додають натрію хлорид (0,5%), встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації значення рН становило 7,0±0,2, кип'ятять, додають лактозу, агар-агар та цистеїн. Суміш фільтрують і стерилізують при температурі 119–121 °C і тиску 0,11 МПа протягом 30 хвилин.

На флакони наклеюють етикетки, де вказано: найменування середовища, кількість і дата приготування. Поживне середовище можливо зберігати при температурі 2–8 °C протягом 7 діб.

3. Приготування середовища МРС-4.

Марганцю сульфат (50 мг), магнію сульфат (200 мг), L-цистеїн (200 мг), калій фосфорнокислий (2 г), амонію цитрат (2 г), натрію ацетат (5 г), глюкозу (20 г) розчиняють при нагріванні в 200 мл води, додають пептон сухий (10 г), Твін-80 (1 мл), дріжджовий автолізат (150 г), печінкової води (100 мл), агар-агар (20 г), воду до об'єму 500 мл, гідролізоване молоко (500 мл). В отриманій суміші встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації в готовому середовищі значення рН становило $6,4 \pm 0,2$, кип'ятять протягом 1 хвилини, розливають у флакони по 100 мл і стерилізують при температурі 112 ± 1 °С 30 хвилин.

На флакони наклеюють етикетки, де вказано: найменування середовища, кількість і дата приготування. Поживне середовище можливо зберігати при температурі 2–8 °С протягом 30 діб.



Завдання 2.

ВИЗНАЧИТИ ВМІСТ АМІННОГО АЗОТУ У ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Принцип методу заснований на блокуванні формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп і титрування лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично.

Хід роботи

У склянку об'ємом 50 мл наливають 10 мл аналізованого розчину і доводять об'єм водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють у досліджуванний розчин, рН якого доводять до 7,0 за допомогою розчину NaOH 0,1 моль/л або HCl 0,1 моль/л. Під час визначення електроди повинні весь час залишатися зануреними в розчин. До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну (рН якого доводять до 7,0 за допомогою 10 % розчину NaOH), перемішують і, не виймаючи електродів, титрують вміст розчином NaOH 0,01 моль/л до рН 9,1. При титруванні використовують бюретки. Проводять три паралельних вимірювання.

Зміст амінного азоту в зразку (X) в мг % визначають за формулою:

$$X = V \cdot K \cdot 1,4 \cdot \frac{100}{\tilde{N}},$$

- де V – об'єм розчину NaOH 0,01 моль/л в мл, що було використано на титрування досліджуваної проби від pH 7,0 до 9,1;
 K – поправка до титру розчину NaOH 0,01 моль/л;
0,14 – кількість амінного азоту в міліграмах, еквівалентну 1 мл розчину NaOH 0,01 моль/л;
100 – коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки;
 N – об'єм досліджуваної проби, взятої для аналізу.



Контрольні запитання

1. Перерахуйте правила роботи з компонентами поживних середовищ.
2. За якими показниками класифікують поживні середовища?
3. Які компоненти мають входити до складу поживного середовища?
4. З якою метою у складі поживних середовищ використовують цукри?
5. З якою метою у складі поживних середовищ використовують амінокислоти?
6. Наведіть класифікацію методів стерилізації.
7. Які методи використовують для стерилізації лабораторного посуду / поживних середовищ?
8. Наведіть методику приготування поживного середовища Блаурокка.
9. Наведіть методику приготування казеїново-дріжджового поживного середовища.
10. Наведіть методику приготування поживного середовища МРС-4.
11. Який метод лежить в основі визначення амінного азоту?

Лабораторна робота 2. ВИРОЩУВАННЯ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ (ПРОБІОТИКІВ) ТА КОНТРОЛЬ ОТРИМАНИХ ПРОДУКТІВ

Мета роботи – оволодіти методиками контролю вмісту живих біфідобактерій і лактобацил. Оволодіти методиками контролю кислотоутворення біфідобактерій і лактобацил і провести вивчення впливу кількості посівного матеріалу на вміст продуктів метаболізму.

Основні завдання:

1. Оволодіти методиками контролю вмісту живих біфідобактерій і лактобацил.
2. Оволодіти методиками контролю кислотоутворення біфідобактерій і лактобацил.
3. Провести вивчення впливу кількості посівного матеріалу на вміст продуктів метаболізму.

Роботу проводять в умовах асептики в лабораторії фармацевтичної біотехнології кафедри біотехнології, біофізики і аналітичної хімії НТУ «ХПІ».

Таблиця 2.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3
Обладнання та матеріали	1. Ваги аналітичні	+	+	+
	2. Шафа сушильний (50-200 °C)	+	+	+
	3. Термостат ($t = (38 \pm 1) ^\circ \text{C}$)	+	+	+
	4. Холодильник 4-8 °C	+	+	+
	5. рН-метр		+	+
	6. Піпетки 5 мл, 10 мл	+	+	+
	7. Циліндри мірні	+	+	+
	8. Колби місткістю 50 і 100 мл	+	+	+
	9. Воронки конусні	+	+	+
	10. Пробірки скляні 20 і 50 мл	+	+	+

Закінчення таблиці 2.1

Реактиви	1. Натр їдкий, Р	+	+	+
	2. Вода очищена, Р	+	+	+
	3. Розчин фенолфталеїну, Р		+	+
	4. Розчин NaOH, 0,1 N, Р		+	+
	5. Штами:			
	✓ Флакони «Лактобактерин» (комерційний)	+	+	+
	✓ Флакони «Біфідумбактерин» (комерційний)	+	+	+



ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

В останні роки в Україні дуже гостро постала проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології. За оцінками лікарів, від 75 до 90 % населення України тією чи іншою мірою страждають на дисбактеріоз. Дисбактеріоз, або синдром надлишкового бактеріального росту, включає зміни видового складу і метаболічної активності кишкової мікрофлори, ускладнює перебіг багатьох захворювань за рахунок порушення функціонування імунної системи організму. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів, зокрема, біфідобактерій та лактобацил, порушуються процеси травлення, погіршується всмоктування речовин, засвоєння заліза та кальцію, синтез вітамінів, втрачається здатність до активізації різних ферментів, знижується стійкість кишечника до надлишкового заселення його умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами. Продукти метаболізму та токсини умовно-патогенних та патогенних бактерій знижують дезінтоксикаційну здатність печінки, пригнічують регенерацію слизового шару кишечника, гальмують перистальтику та призводять до розвитку діареї. Причиною зниження рівня корисної мікрофлори є великий перелік факторів, серед яких головними є неконтрольоване використання антибіотиків та неякісних біологічних добавок, відсутність препаратів, які включають місцеві штами пробіотичних бактерій, недостатнє і нераціональне харчування, шкідливі звички, психо-емоційне перевантаження, надмірне використання пестицидів, консервантів, барвників виробниками продуктів харчування.

Для покращання загального стану організму, з метою підвищення імунного захисту та запобігання розладам роботи шлунково-кишкового тракту (ШКТ) необхідно використовувати комплексний підхід. Лікування повинно бути направлено на зниження надлишкової кількості умовно-патогенної мікро-

флори, відновлення нормальної мікрофлори, стабілізацію моторики шлунку, поліпшення процесів перетравлення та всмоктування у кишечнику. Для вирішення низки поставлених завдань застосовують препарати бактеріального походження, які належать до групи пробіотиків.

Пробіотики (*pro-bios* – для життя) – препарати, які містять живі мікроорганізми, що належать до нормальної, фізіологічно та еволюційно обґрунтованої флори кишкового тракту (біфідобактерії, лактобацили, ентерококи, аерококи, ешерихії та ін.). Вони позитивно впливають на організм хазяїна, сприяють відновленню травлення, біологічного статусу, імунній відповіді, підвищують ефект вакцинації. Симбіонтне травлення відбувається за сприяння анаеробної кишкової мікрофлори і здійснюється переважно у висхідному відділі товстої кишки. При цьому розкладаються не тільки неперетравлені у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту залишки їжі (переважно рослинні волокна), а й інші органічні сполуки. У нормальних фізіологічних умовах протеолітичні і цукролітичні бактерії спільно беруть участь в цьому процесі. Серед метаболітів особливої уваги заслуговують так звані коротколанцюгові летючі жирні кислоти: оцтова, пропіонова, масляна, молочна та ін. До складу препаратів входять представники нормальної мікрофлори людини, що продукують різноманітні за хімічним складом речовини, які виявляють антимікробну активність: перекис, низькомолекулярні кислоти, антибіотикоподібні пептиди, лізоцим та ін. Встановлено, що коротколанцюгові летючі жирні кислоти виконують в організмі ряд найважливіших функцій: енергетичну підтримку, стимуляцію функцій непатогенної симбіонтної флори, протизапальну і бактеріостатичну (щодо патогенної мікрофлори) активність, підтримання необхідних значень рН в кишечнику.

Пробіотики можна використовувати одночасно з антибіотиками, якщо пробіотики включають стійкі до антибіотиків штами (наприклад, лактобіфідол). Якщо штами, що входять в препарат нестійкі до антибіотиків, то його застосовують після антибіотикотерапії для відновлення нормальної мікрофлори. Антагонізм до патогенної флори проявляється в різному ступені у різних препаратів за рахунок продукції органічних кислот, перекисів, низькомолекулярних пептидів. Існує думка, що саме біфідобактерії, що становлять 85-98% мікрофлори кишечника, відіграють визначальну роль в регуляції нормобіоценоза і його стабільності. Клітинні стінки біфідобактерій містять велику кількість мурамідипептида, вивільнення якого сприяє активації Т-, В-лімфоцитів і макрофагів, що грають важливу роль у створенні загальної резистентності організму.

Пробіотики представлені п'ятьма поколіннями:

I покоління – монокомпонентні препарати. Містять один штам бактерій (біфідобактерій, лактобактерій, колібактерій, аерококів та ін.);

II покоління – антагоністи, що самостійно елімінуються з організму. Складаються зі спорових бацил та дріжджеподібних грибів;

III покоління – комбіновані препарати. Містять кілька штамів бактерій. Бактерії, що входять до його складу, можуть належати до одного або різних видів та посилюють дію один одного;

IV покоління – синбіотики – комбінація пробіотичного і пребіотичного компонента;

V покоління – рекомбінантні або генно-інженерні пробіотики створені на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів та метаболітів, мають задані характеристики.

На фармацевтичному ринку України пробіотики представлені доволі широко. Проведений аналіз асортименту лікарських засобів досліджуваної групи показав, що переважно це препарати, які містять біфідо-, колі- та лактобактерії, дріжджі. До Державного реєстру лікарських засобів України включено 30 пробіотиків.

Пребіотики – субстрати, що стимулюють природну мікрофлору, які в нормі надходять в організм людини, і які не перетравлюються і не всмоктуються в шлунку і тонкому кишечнику, а, вступаючи в товстий кишечник, використовуються в якості поживного середовища для нормальної мікрофлори. У людей в перші дні після народження основним пребіотиків є лактулоза, що входить до складу грудного молока.

Аналіз речовин (пребіотиків), що здатні стимулювати ріст нормальної мікрофлори, привів до класифікації пребіотичних компонентів на такі групи:

1) моносахариди і спирти (ксилоза, ксилобіоза, рафіноза, сорбіт);

2) олігосахариди (лактулоза, фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди, ксилоолігосахариди);

3) полісахариди (пектини, декстрин, інулін); ферменти (β -галактозидаза мікробного походження, протеази сахароміцетів); пептиди (соєві, молочні);

4) антиоксиданти (вітаміни групи B, вітамін E, аскорбінова кислота).

Речовини, які належать до пребіотиків, повинні мати дві важливі властивості: не перетравлюватися у верхніх відділах травного каналу; селективно ферментувати мікрофлору товстої кишки, викликаючи активний ріст корисних мікроорганізмів, насамперед, біфідобактерій та лактобацил.

Пребіотичну дію мають полісахариди рослин: наприклад, інулін (полімер фруктози), який міститься у коренях цикорію, плодах топінамбуру; рафіноза – міститься у квасолі та гороху. Ці препарати стимулюють ріст та метаболічну активність однієї чи кількох груп мікроорганізмів облігатної мікрофлори товстого кишечника. Під впливом цих препаратів знижується рН, відбуваються осмотичні зміни, які стимулюють перистальтику товстого кишечника і нормалізують консистенцію калових мас. Відбувається пригнічення росту протеолітичних бактерій за рахунок збільшення кількості ацидофільних бактерій, завдяки чому зменшується утворення аміаку та інших токсинів.

Серед пребіотиків на ринку України лактулоза має найвищий пребіотичний індекс та вважається золотим еталоном у класі препаратів-пребіотиків. Це пов'язано з її властивостями:

1) при щоденному вживанні з молоком 3 г лактулози протягом двох тижнів вміст біфідобактерій у мікрофлорі кишечника збільшується з 8,3 % до 47,4 %, а кількість клостридій значно зменшується;

2) значно знижує вміст токсичних метаболітів (аміак, скатол, індол) і ферментів (β -глюкоронідази, нітроредуктази, азоредуктази);

3) знижує абсорбцію кальцію, тому є одним із методів профілактики остеопорозу;

4) стимулює перистальтику кишечника, підвищує вміст води у товстій кишці і осмотичний тиск;

5) знижує секрецію жовчі у просвіт тонкої кишки;

6) має антиканцерогенну дію, пов'язану з активацією імунної системи клітинами біфідобактерій, компонентами клітинних стінок.

Синбіотики – це раціональна комбінація пробіотиків і пребіотиків.

На сьогоднішній день у різних країнах створено велику кількість біологічно активних добавок і лікарських препаратів, основу яких становлять культури представників нормальної мікрофлори людини. Як правило, використовуються різні штами біфідо- та лактобактерій, непатогенні штами кишкової палички та ентерококів.

Найвідоміші мікроорганізми, що використовуються як основа біопрепаратів – лактобацили. Відомо про використання *Lactobacillus plantarum*, *L. fennentum*, *L. casei*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. reuleri*, *L. lactis* для виробництва пробіотиків.

Біфідобактерії – інша група мікроорганізмів, на основі якої базуються багато пробіотиків. Застосовують *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. thermophilus*.

Кишкові палички почали вживати як основу біопрепаратів ще з 1918 року в складі Мутафлору. Для розробки пробіотиків, що містять кишкову паличку використовують штам *E. coli* М-17.

Для розробки пробіотиків використовують й інші мікроорганізми, що належать до роду *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Найчастіше вони входять до складу заквасок для одержання ферментованих кисломолочних продуктів із пробіотичними властивостями (йогурти, м'які та тверді сири, кисляк тощо). Дотепер основою для виробництва йогурту є штам *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. До складу пробіотиків входять *Streptococcus faecium*, *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *S. intermedius*.

Повіdomляють також про застосування дріжджів для виробництва пробіотиків. Препарат, до складу якого входили *Saccharomyces boulardii*, виявився ефективним при лікуванні кишкових інфекцій, зумовлених *Clostridium difficile*. Виражений клінічний ефект отримано також при використанні *Saccharomyces cerevisiae*.

В останні роки спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* як найяскравіші представники екзогенної мікрофлори привертають увагу дослідників. Досить великий арсенал видів цього роду випробували як терапевтичні засоби при лікуванні гострих і хронічних інфекцій: *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* тощо. Однак найповніше вивчені види *B. subtilis* і *B. licheniformis*.

Зазначені препарати застосовують *per os* і показані при:

- ✓ хронічних колітах різної етіології, зокрема неспецифічних виразкових колітах, соматичних захворюваннях, ускладнених дисбактеріозами;
- ✓ гострих кишкових інфекціях (дизентерія, сальмонельоз, ешерихіоз, вірусні діареї та ін.);
- ✓ в акушерсько-гінекологічній практиці для санації статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій та передпологовій підготовці вагітних групи "ризик" із порушенням чистоти вагінного секрету;
- ✓ лікуванні та профілактиці у дорослих і дітей з перших днів життя дисбіозу кишечника, що виникає внаслідок антибактеріальної, гормональної, променевої та інших видів терапії;

✓ лікуванні дисбіозів і запальних захворювань жіночої статеві сфери (бактеріальних вагінозів, у тому числі у вагітних, бактеріальних кольпітів, викликаних стафілококом та кишковою паличкою, сенільних кольпітів гормональної природи).

Слід зазначити, що препарати на основі пробіотичних штамів біфідобактерій і лактобацил застосовуються у неонатології, з метою нормалізації мікробіологічного фону ШКТ новонароджених. Побічні реакції при застосуванні препаратів можливі за умови реакції гіперчутливості до компонентів препарату.

Біфідобактерії становлять основу мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини. В наш час рід *Bifidobacterium* включає 32 види. Морфологія біфідобактерій представлена на рис. 2.1. Видовий склад біфідофлори визначається характером харчування. Найважливіше значення для ШКТ людини відіграють *B.bifidum*, *B.infantis*, *B.breve*, *B.longum* та *B.adolescentis*. На сьогодні відкрито також нові різновиди – *B.lactis*, *B.inopintanum*, *B.denticolens*.

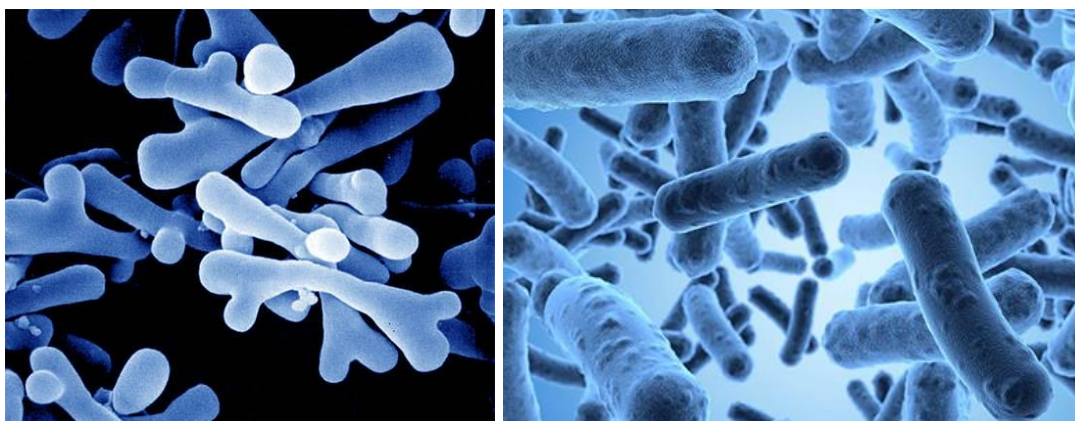


Рисунок 2.1 – Морфологія біфідобактерій (зліва) і лактобацил (справа)

Елімінація чи значне зниження їх кількості в ШКТ ведуть до глибоких порушень процесів травлення і всіх видів обміну. На фоні дефіциту біфідофлори найактивніше проявляється патогенна дія стафілококу, протеїв, грибів роду *Candida*. Біфідобактерії являють собою поліморфні палички з біфуркаціями на одному чи двох кінцях, які розташовуються у вигляді скупчень або окремих клітин, парами, ланцюгами, полісадом чи разетками. Нерухомі, спор не утворюють. Грампозитивні, забарвлення часто нерівномірне. Ці палички досить варіабельні. На ранніх стадіях розвитку в популяції спостерігаються переважно паличкоподібні клітини довжиною до 8 мкм, товщиною в середньому 0,4–0,5 мкм. Клітинна стінка однорідної густини, товщиною 16 нм, іноді зустрічаються ділянки нерівномірної товщини. Цитоплазматична мембрана має стру-

ктуру з трьох шарів сумарною товщиною 9 нм. Розмноження відбувається шляхом формування поперечних перегородок. На рівні сформованої септи в поперечній перегородці клітинна стінка товща від бічної. Поступово в культурах з'являється сильно виражений поліморфізм бактеріальних клітин. Розмноження може відбуватися одночасно чи послідовно на деяких ділянках тіла однієї клітини чи її відростків, внаслідок чого утворюються ланцюги клітин нерівномірної довжини без ознак відокремлення особин, що входять у їх склад.

У пізніший термін культивування в популяціях переважають ланцюги чи конгломерати клітин, частина з подвоєними кінцями, які продовжують рости в довжину. Ці особливості морфології біфідобактерій можна вважати реакцією на умови середовища, в якому вони мешкають, що виявляється на клітинному і популяційному рівнях.

В 0,72 %-вому печінковому і гідролізатно-молочному агарах біфідобактерії утворюють колонії у вигляді зерна чи у вигляді дисків розміром до 3 мм у діаметрі. В рідких поживних середовищах біфідобактерії ростуть по всій висоті об'єму, крім зони аеробіозу. Пігментів не утворює. Деякі види можуть рости в атмосфері повітря, збагаченого 10 % CO₂. Не ростуть при pH < 4,5 чи > 8,5. Здатні рости при температурі від 20 °C до 45 °C, однак оптимальною є температура 38±1 °C. Вважаються непатогенними.

Біфідобактерії мають ряд особливостей в енергетичному обміні, потребі в ростових факторах. Являючись анаеробами, вони можуть почати ріст лише у відсутності кисню і при достатньо низькому окисно-відновному потенціалі середовища. В тонкому відділі кишечника через низький pH і достатньо високий рівень кисню можливий лише незначний ріст мікроорганізмів. Вже в процесі формування захисних біоплівки відбувається більш стабільне розселення мікрофлори по специфічних для них локусах. Біфідобактерії як найбільш строгі анаероби колонізують найближчу до епітелію зону, де завжди підтримується від'ємний окисно-відновний потенціал (причому не лише в товстій кишці, а й в інших, більш аеробних біотопах організму: в ротоглотці, піхві, на шкіряних покривах). Біфідобактерії є хемоорганотрофами, активно зброджують вуглеводи з утворенням оцтової і молочної кислоти. При культивуванні потребують вітамінів. Газоутворююча властивість, каталазоутворююча властивість, здатність розрідження желатину відсутні.

Біфідобактерії стійкі до кананіцину, мономіцину. Чутливі до антибіотиків пеніцилінового ряду, гентаміцину.

Біфідобактерії проявляють антагоністичну активність по відношенню до *Sh. sonnei*, *Sh. Flexneri*, ентеропатогенних кишечних паличок, стафілококів.

Біфідобактерії недостатньо стійкі до шкідливих факторів середовища культивування і агресивних середовищ гастроінтестинального тракту (кислоти, протеолітичні ферменти).

Позитивний вплив біфідофлори на фізіологічні функції організму дітей і дорослих пов'язують з продукцією нею молочної та оцтової кислоти, які створюють в кишечнику кислу реакцію, що попереджає розмноженню патогенної, гнилісної та газоутворюючої мікрофлори. Біфідобактерії здатні виділяти бактеріоцини (біфідин та біфілонг), які проявляють антимікробну активність по відношенню до багатьох видів ентеробактерій, вібріонів, стрептококів та стафілококів.

Існують дані, що біфідобактерії є постачальниками низки незамінних амінокислот, вітамінів, встановлена їх антиканцерогенна та антимуtagenна активність, здатність знижувати рівень холестерину в крові. Кислоти, які продукують біфідобактерії, – бактеріоцини – попереджають проникнення мікрорганізмів у верхні відділи ШКТ та сприяють формуванню неспецифічної резистентності. Виражена протективна активність біфідобактерій обумовлена їх високою адгезивністю до слизової товстого кишечника.

Також слід зазначити, що *B. infantis* та *B. adolescentis* знижують утворення в кишечнику метаболітів (нітритів, нітрозамінів, крезолу, індолу, аміаку), які мають канцерогенний потенціал, а також нормалізують обмін стероїдних гормонів.

Біфідобактерії мають протективну дію на синтез IgA та гальмують деградацію секреторного IgA в кишечнику, посилюють фагоцитоз, нормалізують співвідношення CD4/CD8, підвищують утворення інтерлейкінів (IL-6, IL-1b), підвищують продукцію g-інтерферону.

Фізіологічне значення біфідобактерій суттєво доповнюють дані про те, що вони сприяють кращому засвоєнню солей кальцію, вітаміна D, заліза, отже, мають антирахітичні та антианемічні властивості.

Лактобацили – безспорові, грам-позитивні паличкоподібні бактерії, зазвичай правильної форми, з розмірами від 0,5–1,2 до 1,0–10,0) мкм. Як правило, палички довгі, але інколи можуть бути майже кокоподібної форми, у вигляді коротких ланцюгів. Морфологія лактобацил представлена на рис. 2.1. рампозитивні, спор не утворюють; у рідких випадках рухомі за рахунок перитрихіальних джгутиків. Клітинна стінка являє собою гомогенний електронно-міцний

шар товщиною 15–60 мкм. Розмножуються шляхом розділення клітин, іноді перешнуровуванням.

Лактобацили – факультативні анаероби, іноді мікроаерофіли. Слабко ростуть на повітрі, краще – при зниженому вмісті кисню. Ріст звичайно стимулюють додаванням 5 % CO₂. Колонії на агаризованих середовищах мають діаметр 2–5 мм, випуклі, з цільними краями, непрозорі, не пігментовані. Хемоорганотрофи; потребують багатих складних поживних середовищ. Метаболізм бродильного типу, цукропластичний; майже половина вуглецю кінцевих продуктів бродіння випадає на лактат. Нітрати не відновлюють; желатин не розріджують; каталазонегативні; цитохромів не містять. Вирощування лактобацил проводять на середовищах МРС (молочне ростове середовище) та КД-5 (казеїново-дріжджове). Оптимальна температура росту лактобацил – 37±1 °С. Показники кислотності середовища для різних штамів відрізняються і знаходяться у межах 5,5–7,0.

Найважливішим джерелом енергії є моно- та дисахариди, органічні кислоти в концентрації 30–50 мкг/мл. Із жирних кислот ріст лактобацил стимулюють олеїнова, лінолева та ліноленова кислоти. Для нормального росту необхідними є ряд амінокислот: аргінін, цистеїн, глютамінова кислота, лейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин, валін; вітаміни: пантотенова, нікотинова кислоти, біотин, тіамін; сполуки міді, заліза, натрію, калію, фосфору, йоду, сірки, магнію та марганцю.

На основі продукції вуглекислоти із глюкози, необхідності у тіаміні, ферментації фруктози до маніту та продукції фруктозодифосфатальдолази лактобацили поділяють на дві групи: гомо- та гетероферментативні. В наш час лактобацили поділяють на три філогенетичні групи: *L.delbrueckii*, *L.casei*-*Pediococcus*, *Leuconostos*. Рід *Lactobacillus* поєднує 56 видів і 11 родів.

Лактобацили мають високу адгезію до слизових оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару, завдяки чому вони особливо важливі при патології ШКТ та урогенетального тракту. Встановлено, що деякі види лактобацил знижують ризик утворення каменів у нирках завдяки оксалатмодифікуючій активності.

У процесі метаболізму лактобацили продукують органічні кислоти (головним чином молочну), перекиси, антибіотики та бактеріоцини. Утворення цих компонентів розцінюється як критерій антагоністичної активності лактобацил, що забезпечує їх антибактеріальний ефект по відношенню до представників патогенної та умовно-патогенної флори. Визначено участь лактобацил у противі-

русному імунитеті, зокрема, при реалізації захисту від гепатотропних вірусів. Встановлено, що лактобацил можуть діяти як ад'юванти гуморальної імунної відповіді у людей та експериментальних тварин. Доведено безпосередню активізуючу дію лактобацил на Т-кілери та В-лімфоцити. Наведені дані, що лактобацил мають виражену здатність попереджати загострення виразкового коліту, мати виражений терапевтичний ефект при діарей новонароджених різної патології. Встановлений факт вираженого впливу *L.acidophilus* на імунну систему організму шляхом стимуляції міграції моноцитів, активації фагоцитарної активності. Імуностимулююча дія лактобацил пов'язана з присутністю в їх клітинній стінці пептидогліканів та тейхових кислот, з утворенням аргініну та окису азоту, а також попередженням адгезії сторонніх мікроорганізмів і утворення ними ендотоксину. В наш час ацидофільні лактобацил використовують або в монокультурі, або в комплексі з різними видами біфідобактерій у складі біологічно активних препаратів, харчових добавок та кисломолочних продуктів. Лактобацили широко розповсюджені у навколишньому середовищі, особливо часто зустрічаються у харчових продуктах тваринного і рослинного походження. Лактобацили знайдені протягом всього ШКТ, а також є основною мікрофлорою пологових шляхів. Входять до складу нормальної мікрофлори ШКТ у птиць та ссавців. Не патогенні. Встановлено, що природним середовищем існування молочнокислих бактерій є ґрунт та ризосфера рослин.

До складу ряду препаратів входять **бактерії роду *E. Coli***, зокрема штам *E. Coli M17*. Штам являє собою грамнегативну паличку довжиною 1,5-4 мкм, шириною 0,3-0,8 мкм, зі злегка закругленими кінцями. Галактозу, лактозу, маніт, глюкозу ферментує з утворенням кислоти і газу. Штам *E. Coli M17* на відміну від інших штамів *E. Coli* ферментує сахарозу, що використовується як відмінна ознака штаму при визначенні ступеня приживлення його в кишечнику. Штам є гетеротрофним факультативним аеробом, в умовах аерації активно дезамінує амінокислоти і здатний до переходу від бродіння до дихання, з активацією енергозабезпечення культури. Оптимальна температура росту 37 ± 1 °C. Препарати пробіотиків на основі штамів *E.Coli* (Біфікол, Колібактерин та ін.) відомі в медичній практиці.

Перспективним напрямком розробки нових біопрепаратів є використання **бактерій роду *Bacillus***. Ці бактерії завдяки високим адаптаційним можливостям широко розповсюджені в природі, зокрема, в тих об'єктах, з якими людина контактує найчастіше (харчові продукти, вода, повітря та ін.). Завдяки цьому бацили постійно і в значних кількостях надходять до організму людини, і оскі-

льки є стійкими до літичних і травних ферментів, зберігають свою життєздатність у всьому кишково-шлунковому тракті. Таким чином, аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* є одним із найважливіших компонентів екзогенної мікрофлори людини. Серед інших представників екзогенної мікрофлори бацили мають ряд переваг, що дозволяють їх використання для створення біопрепаратів, а саме: бацили (крім *B. anthracis* і *B. cereus*) нешкідливі для організму людини і тварин; ряд штамів мають високу анатогоністичну активність; характеризуються високою ферментативною активністю в процесах травлення; стабільні при зберіганні; безпечні для довкілля. Здатність спороутворюючих бактерій проявляти пробіотичну дію привело до розробки на їх основі препаратів, віднесених до покоління «самоелімінуючихся антагоністів». Сьогодні у світі створено понад 50 лікувальних препаратів, які повністю або частково складаються із бацил. Біопрепарати на основі бактерій роду *Bacillus* – Біоспорин (Україна, Росія), Споробактерин (Росія) – *B. subtilis*, Бактиспорин (Росія) – *B. subtilis*, Бактисубтил (Франція) – *B. cereus* IP 5832, Лакбон (Японія) – *B. coagulans*, Флора-баланс (США) – *Brevibacillus laterosporus*, Натуріс (США) – із 42 штамів у тому числі: *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. laterosporus*.

Цікавим є пробіотичний препарат «Ентерожерміна» – пробіотик на основі непатогенних спороутворюючих штамів *Bacillus clausii*, який випускається у формі суспензії для перорального прийому. Особливість препарату полягає в тому, що спори *B. clausii* є стійкими до дії шлункового соку та жовчних кислот, перетворюється на вегетативні форми у кишечнику, включаються до складу мікробіоти товстого кишечника та пригнічують зростання патогенних мікробів. *B. clausii* має протеолітичну та фібринолітичну дію щодо умовнопатогенної та патогенної флори кишечника.

Незважаючи на переконливі дані, що свідчать про постійну присутність **пропіоновокислих бактерій** в різних біотопах людини, досліджень, які присвячені фізіологічній значущості даної групи прокаріот, як одного з найважливіших компонентів облігатної мікробіоти, значно менше, ніж аналогічних досліджень щодо лактобацил і біфідобактерій. Пропіоновокислі бактерії – грампозитивні, не утворюють спор, нерухомі, факультативно-анаеробні або аеротолерантні паличкоподібні бактерії від 0,5 мкм до 1,5 мкм. Зазвичай плеоморфні, дифтероїдні або булавоподібні палички з одним закругленим, іншим конусоподібним або загостреним кінцем. Клітини в молодих культурах – викривлені, злегка зігнуті палички, в старших – кокоподібної форми. У травному

тракті здорових дорослих людей пропіоновокислі бактерії присутні в кількості не менше 10^5 КУО/г фекалій.

У теперішній час достатньо даних, які свідчать про наявність пробіотичних властивостей у пропіоновокислих бактерій. Пропіоновокислі бактерії стійкі до дії жовчних кислот і витримують низьку кислотність шлунка (рН 2,0). Класичні пропіоновокислі бактерії здатні до біосинтезу нутрицевтиків (вітамінів В₂, В₇, В₉, В₁₂, К, кон'югованої ліноленової кислоти). Оздоровчі ефекти можуть бути пов'язані із впливом на склад кишкової мікробіоти, за винятком патогенів, модуляцією метабіотичної активності мікробіоти і хазяїна, імуномодуляцією. Основним продуктом життєдіяльності пропіоновокислих бактерій є пропіонова кислота. Біосинтез пропіонової кислоти цими бактеріями включає в себе складний метаболічний цикл з кількома реакціями, в яких субстрати метаболізуються до пірувату за гліколітичним шляхом, генеруючи АТФ і відновлені кофери-менти. Потім піруват декарбоксилюється до ацетату і СО₂ або до пропіонату. Вітамін В₁₂ є незвичайним щодо свого походження. Практично всі вітаміни можуть бути виділені з різноманітних рослин або тварин, але жодна рослина чи тварина не здатна виробляти вітамін В₁₂. Джерелом цього вітаміну, за сучасними даними, є пропіоновокислі бактерії. Біосинтез вітаміну В₁₂ відбувається паралельно накопиченню їх біомаси. На синтез вітаміну сприятливо впливає наявність молочної кислоти, створюючи елективність умов. У той же час пропіоновокислі бактерії значно стимулюють ріст біфідобактерій, оскільки є продуцентами ростових біфідогенних стимуляторів, що мають виражені пребіотичні ефекти. Дослідження показало, що концентрація ростових біфідогенних стимуляторів коливається в межах від 0,1 до 1 мкг/л. Такі штами пропіоновокислих бактерій як *P. freudenreichii* ET-3, *P. shermanii* PZ-3, *P. acidipropionici* JCM 6432, *Propionibacterium jensenii* JCM 6433, продукують ростові біфідогенні стимулятори в кількості 4–23 мг/л в анаеробних умовах культивування. Показано, що фільтрат культурального середовища пропіоновокислих бактерій має виражений селективний стимулюючий ефект щодо зростання біфідобактерій. На відміну від пребіотиків вуглеводної природи, біфідогенний ефект яких пов'язаний зі стимуляцією росту пробіотичних мікроорганізмів шляхом збагачення поживного середовища джерелом вуглецю.

Представники класичних видів пропіоновокислих бактерій утворюють ряд білкових бактеріоцинів. Види *P. thoenii* і *P. jensenii* утворюють термостійкі білки, які інгібують ряд грамнегативних і грампозитивних бактерій, дріжджів та цвілі. Експериментальні та клінічні випробування препаратів на основі пропіо-

новокислих бактерій показали імуномодуючу, антивірусну активність в клінічних дослідженнях, що пов'язують з активацією моноцит-макрофагової системи, індукцією синтезу інтерферону і активацією кілерних клітин. Пропіоновокислі бактерії відомі вираженою антимуtagenною дією. Метаболіти пропіоновокислих бактерій підвищують активність ферментних систем, що беруть участь в детоксикації речовин, які надходять в клітину. Впливаючи на окисно-відновний потенціал організму, ці процеси приводять до зниження кількості мутацій. Важливу роль в організмі відіграють антиоксидантні ферменти, синтезовані пропіоновокислими бактеріями: супероксиддисмутаза і каталаза, що інактивують вільні радикали кисню, не даючи їм можливості запустити ланцюгові процеси окислення, а глутатіонпероксидаза знешкоджує ліпідні перекиси.

Таким чином, пропіоновокислі бактерії та їхні метаболіти служать важливим фактором у підтримці балансу мікробної екосистеми людини, тому актуальною є розробка пробіотичних препаратів нового покоління з включенням пропіоновокислих бактерій.



Завдання 1.

ОВОЛОДИТИ МЕТОДИКАМИ КОНТРОЛЮ ВМІСТУ ЖИВИХ БІФІДОБАКТЕРІЙ І ЛАКТОБАЦИЛ

Хід роботи

1. Визначення вмісту живих лактобацил.

Для визначення кількості живих лактобацил в одній дозі препарату вміст одного флакона розчиняють у 0,9%-вому розчині натрію хлориду із розрахунку 1 мл на 1 дозу. Отриману суспензію лактобацил в об'ємі 1 мл переносять в пробірку з 9 мл 0,9%-вого розчину натрію хлориду, ретельно перемішують, одержуючи 1 дозу лактобацил в 10 мл суспензії. З цієї пробірки отримують наступні десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-9} . З отриманих розведень 10^{-6} і 10^{-7} висівають по 0,1 мл мікробної суспензії на дві чашки Петрі з середовищем МРС-4. Біомасу втирають шпателем в поживне середовище. Після інкубування при температурі 37 ± 1 °C протягом 44 ± 4 годин проводять підрахунок колоній живих лактобацил. Проводять підрахунок колоній для кожного розведення і обчислюють середнє арифметичне.

Приклад розрахунку:

60 колоній – в розведенні 10^7 ;

540 колоній – в розведенні 10^6 .

$$\frac{60 \cdot 10^7 + 540 \cdot 10^6}{2} \cdot 10 = \frac{6 \cdot 10^8 + 5,4 \cdot 10^8}{2} \cdot 10 = \frac{11,4 \cdot 10^8}{2} \cdot 10 = 5,7 \cdot 10^9 = 5,7 \text{ млрд}$$

10 – враховує ступінь розведення, оскільки на чашку висівали 0,1 мл.

В одній дозі препарату повинно бути не менше 4-х мільярдів живих лактобацил.

2. Визначення вмісту живих біфідобактерій.

Для визначення кількості живих біфідобактерій в одній дозі препарату вміст кожного флакона розчиняють у 0,9%-вому розчині натрію хлориду із розрахунку 1 мл на 1 дозу. Отриману суспензію біфідобактерій в об'ємі 1 мл переносять в пробірку з 9 мл середовища Блаурокка, ретельно перемішують, одержуючи 1 дозу біфідобактерій в 10 мл середовища. З цієї пробірки отримують наступні десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-9} . Зазначені пробірки інкубують при температурі 38 ± 1 °C протягом 2-4 днів в залежності від використовуваного штаму біфідобактерій. Після закінчення інкубації визначають розведення, в якому спостерігається зростання колоній біфідобактерій у вигляді «зерен», «цвяшків» та ін. Вважається, що препарат відповідає вимогам, якщо зростання біфідобактерій в серії десятикратних розведень визначається не менше ніж в пробірці з розведенням 10^{-7} (сьома пробірка), що відповідає змісту 10^7 живих біфідобактерій в одній дозі.



Завдання 2.

ОВОЛОДИТИ МЕТОДИКАМИ КОНТРОЛЮ КИСЛОТУ-УТВОРЕННЯ БІФІДОБАКТЕРІЙ І ЛАКТОБАЦИЛ

Визначення проводять титрометричним методом при вирощуванні бактерій на відповідних поживних середовищах. До висушеного препарату пробіотика додають культуральне середовище з розрахунку 1 мл середовища на одну дозу препарату: середовищек МРС-4 – для лактобацил або середовище Блаурокка – для біфідобактерій.

Хід роботи

1. Визначення кислотообrazовання лактобацил.

Для лактобацил: у 2 пробірки з 25 мл поживного середовища МРС-1 вносять по 2,5 мл суспензії препарату. Суміш перемішують та інкубують протягом 48 годин при температурі $37 \pm 0,5$ °С. Після закінчення інкубації визначають кислотність в кожній пробірці шляхом титрування 10 мл зразка 0,1 моль/л розчином натрію гідроксиду в присутності індикатора фенолфталеїну (3 краплі) до величини рН – $(8,5 \pm 0,1)$ потенціометрично. Обчислюють середній показник з двох визначень.

2. Визначення кислотообrazовання біфідобактерій.

Для біфідобактерій: у 2 пробірки з 25 мл середовища Блаурокка вносять по 2,5 мл суспензії препарату. Суміш перемішують і інкубують протягом 72 години при температурі 38 ± 1 °С. Після закінчення інкубації визначають кислотність в кожній пробірці шляхом титрування 10 мл зразка 0,1 моль/л розчином натрію гідроксиду в присутності індикатора фенолфталеїну (3 краплі) до величини рН – $(8,5 \pm 0,1)$. Обчислюють середній показник з двох визначень.

Кислотність в градусах Тернера (°Т) визначають за формулою:

$$^{\circ}\text{T} = A \cdot \kappa \cdot 10,$$

де А – кількість мл розчину натрію гідроксиду, який пішов на титрування;

10 – поправка до титру розчину натрію гідроксиду.

Активність кислотоутворення: для лактобацил – не менше 200 °Т; для біфідобактерій – не менше 90 °Т.



Завдання 3.

ПРОВЕСТИ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ КІЛЬКОСТІ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ НА ВМІСТ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ

Хід роботи

Вивчення впливу обсягу посівного матеріалу на інтенсивність росту штамів пробіотиків при визначенні продуктів метаболізму (кислот) проводять за такою методикою: у флакони, що містять 300 мл отриманої казеїново-дріжджового поживного середовища додають 20% і 40% інокулята лактобацил або біфідобактерій, отриманих після 48 годин інкубації при $38 \pm 0,5$ °С. Флакони перемішують і поміщають в термостат при температурі $38 \pm 0,5$ °С. Через кожну

годину в асептичних умовах відбирають по 10 мл суспензії, в якій визначають кислотність.

Отримані дані оформлюють у вигляді графіка залежності кислотного числа у °Т від часу культивування та обсягу посівного матеріалу. З кожної проби має бути отримано п'ять точок (протягом 5 годин).



Контрольні запитання

1. Яка роль пробіотиків у організмі людини?
2. З якою метою здійснюється прийом препаратів пробіотиків?
3. Вкажіть основні властивості штамів пробіотиків. Яка роль пребіотиків в препаратах?
4. Які форми препаратів пробіотиків Вам відомі? Навести приклади .
5. Що таке пребіотики та синбіотики? Навести приклади.
6. Охарактеризувати пробіотичні штами: лактобацили.
7. Охарактеризувати пробіотичні штами: біфідобактерії.
8. Охарактеризувати пробіотичні штами: пропіоновокислі бактерії.
9. Охарактеризувати пробіотичні штами: бацил та *E. coli*.
10. Які технологічні вимоги проведення санітарної підготовки виробництва?
11. Охарактеризувати поживні середовища та технології їх одержання для біфідобактерій, лактобацил та пропіоновокислих бактерій. Вимоги до середовищ.
12. Дайте визначення показника «кислотоутворення штамів».
13. Опишіть залежність накопичення кислот при культивуванні штамів пробіотиків від обсягу внесеного інокулята.
14. Вкажіть формулу розрахунку кислотоутворення штамів пробіотиків.
15. Опишіть реакції при визначенні амінного азоту. З якою метою проводять визначення амінного азоту?

Лабораторна робота 3. ВИДІЛЕННЯ ФЕРМЕНТУ ГІАЛУРОНІДАЗИ І ВИЗНАЧЕННЯ ЇЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Мета роботи – здійснити виділення і очищення тканинного ферменту (гіалуронідази) з сім'яників великої рогатої худоби. Вивчити вплив рН на вихід цільового продукту. Визначити наявність гіалуронідазної активності у отриманих зразків ферменту в екстракті.

Основні завдання:

1. Виділення ферменту гіалуронідази з тваринної тканини при різних умовах технологічного процесу. Приготування субстрату для визначення гіалуронідазної активності і визначення її в отриманому екстракті

Таблиця 3.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1
Обладнання та матеріали	1. Центрифуга лабораторна	+
	2. Пробірки	+
	3. Ваги аналітичні	+
	4. Спектрофотометр	+
	5. Плитка електрична	+
	6. Мішалка електрична	+
	7. Насос водоструменевий	+
	8. Шафа сушильна (50-200 °C)	+
	9. Холодильник побутовий з морозильною камерою	+
	10. Баня водяна	+
	11. Центрифуга лабораторна	+
	12. Воронка Бюхнера	+
	13. Колба Бунзена	+
	14. Піпетки 5 мл, 10 мл	+
	15. Циліндри мірні	+
	16. Колби місткістю 50 мл і 100 мл	+
	17. Бюкси скляні	+
	18. Воронки конусні	+
	19. Папір фільтрувальний	+

Закінчення таблиці 3.1

Сировина	1. Сім'яники великої рогатої худоби	+
	2. Пупкові канатики людини (пуповина)	+
Реактиви	1. Ацетон, Р	+
	2. Вода очищена, Р	+
	3. Альбумін бичачий або людини, Р	+
	4. Кислота оцтова, Р	+



ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Гіалуронідаза – це фермент, що викликає гідроліз гіалуронової кислоти, основної формоутворюючої субстанції сполучної тканини. В результаті гідролізу гіалуронової кислоти до утворення глюкозаміну і глюкуронової кислоти знижується її в'язкість і підвищується проникність сполучної тканини. На рис. 3.1 представлена структура повторюваної дисахаридної одиниці в молекулі гіалуронової кислоти.

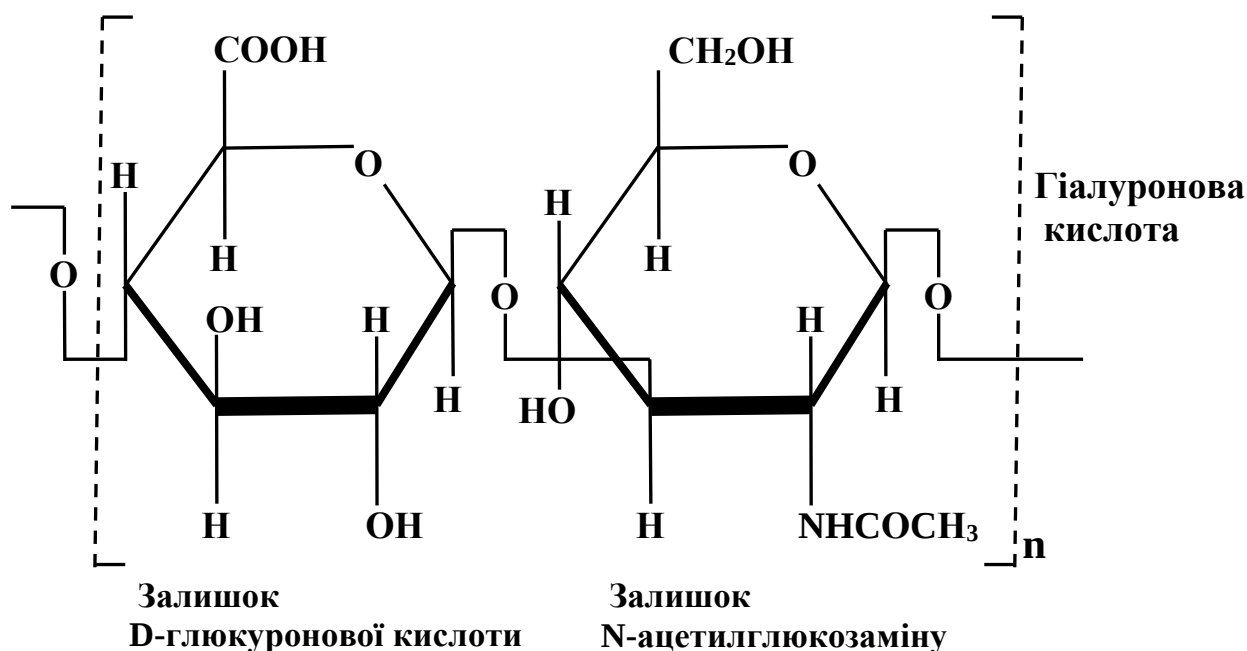


Рисунок 3.1 – Структура повторюваної дисахаридної одиниці в молекулі гіалуронової кислоти

Гіалуронова кислота у поєднанні з білком становить основу міжклітинної субстанції сполучної тканини, так званої «основної субстанції». Гіалуронідаза використовується в складі лікарських препаратів, наприклад, препарат під назвою «Лідаза». Препарат використовується для лікування рубців після опіків і операцій, гематом, контрактури суглобів, рубців рогівки.

Фермент присутній в оболонках патогенних бактерій, спермі, отруті змій, павуків, бджіл, слинних виділених п'явок, швидко зростаючих пухлинах. Гіалуронідаза мікрорганізмів і отрут, руйнуючи гіалуронову кислоту міжклітинної речовини, сприяє поширенню інфекції в глиб тканини організму. Гіалуронідаза сперми, розчиняючи фолікулярний шар яйцеклітини, створює сприятливі умови для її запліднення.

Присутні на ринку, в даний момент, препарати з гіалуронідазою як діючою речовиною виробляються переважно з використанням тестикулярної гіалуронідази, одержуваної з сім'яників великої рогатої худоби. Однак, раціональної заміною такої гіалуронідази може стати гіалуронідаза, одержана за допомогою мікробіологічного синтезу.

Для виробництва гіалуронідази з використанням як продуцента *Pseudomonas putida* за схемою, представленою на рис. 3.2 [10]:

- у ферментер 1 завантажується стерильне живильне середовище (склад: автолізат пивних дріжджів – 26,8 г/л; K_2HPO_4 – 1,5 г/л; $MgSO_4$ – 1,5 г/л; вода), підігріте до 26–28 °С (рН 6,9–7,1), і суспензія клітин продуцента гіалуронідази із вмістом клітин від $5 \cdot 10^5$ до 10^6 в 1 мл суспензії. Ферментація ведеться протягом 16 годин при температурі 26–30 °С, при рН 6,9–7,3. Під час ферментації постійно ведеться контроль температури і рН;

- після закінчення ферментації культуральна рідина, що містить культуру продуцента, подається за допомогою насоса 2 у центрифугу 3, де відбувається відділення культури продуцента від культуральної рідини при обертанні центрифуги зі швидкістю 6000–6500 об./хв;

- отриманий при центрифугуванні нативний розчин надходить у реактор 4, де відбувається його підкислення до значення рН 4,4–4,6 1 %-вим розчином оцтової кислоти при постійному перемішуванні;

- підкислений нативний розчин подається насосом 5 в колону з сорбентом 6, в якій білок, що містить гіалуронідазу сорбується на сульфокатіоніті КУ-23. Після проходження всього розчину через колону, її промивають дистильованою водою, після чого відбувається десорбція білка розчином сульфату амонію при рН 9,1–9,4;

- отриманий елюат подається насосом 7 в систему ультрафільтрації 8, де відбувається відділення білка від розчину солей і більшої частини води;
- розчин, що містить гіалуронідазу, надходить в систему розливу 9, в якій відбувається розлив його у флакони об'ємом 10 мл. Флакони закриваються пробками для ліофільної сушки і завантажуються на полиці ліофільної сушки 10. Після висушування флакони закриваються і упаковуються.

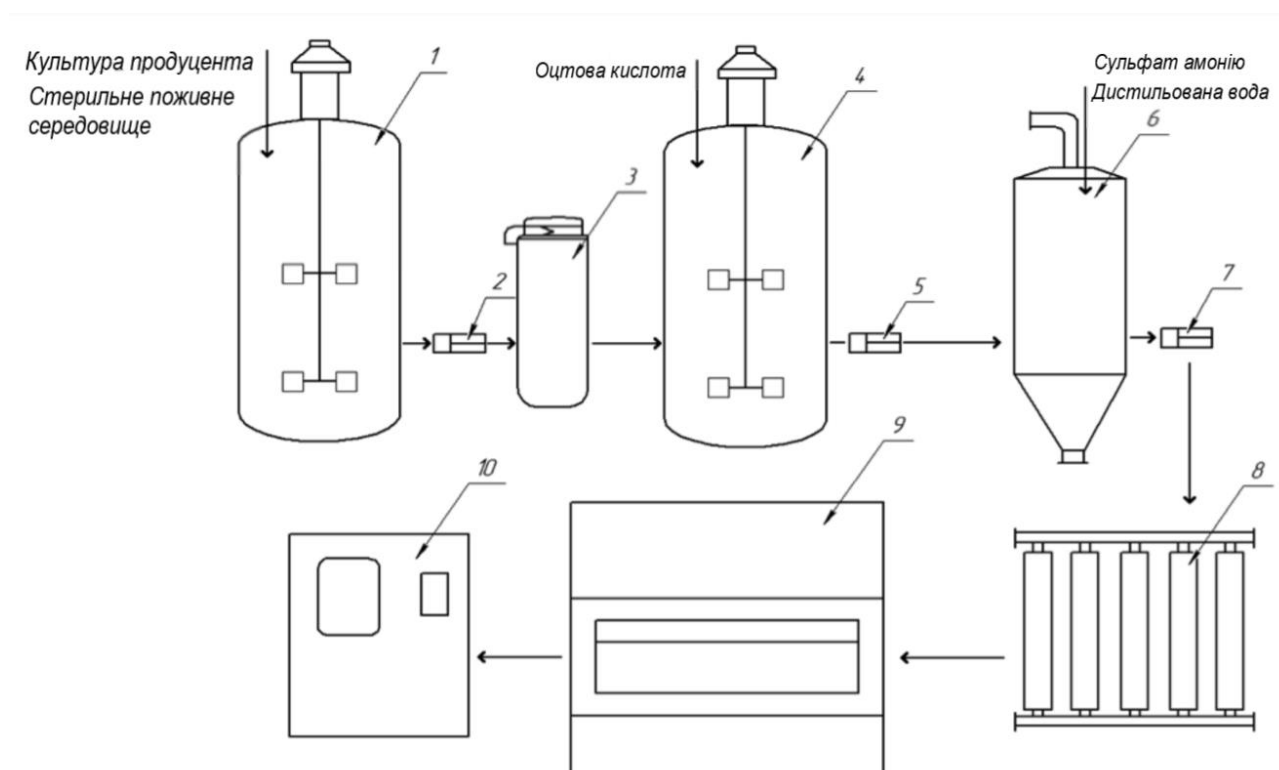


Рисунок 3.2 – Апаратурна схема біотехнологічного одержання гіалуронової кислоти: 1 – ферментер; 2, 5, 7 – насоси; 3 – центрифуга; 4 – реактор для підкислення нативного розчину; 6 – сорбційна колона; 8 – система ультрафільтрації; 9 – лінія розливу; 10 – ліофільна сушка

Характеристика готового продукту:

- ✓ питома гіалуронідазна активність – не менше 50 од./мг;
- ✓ рН-оптимум дії – 5,0;
- ✓ температурний оптимум дії – $37 \pm 0,5$ °С.

Гіалуронідазну активність визначають за реакцією гідролізу гіалуронової кислоти.



Завдання 1.

ВИДІЛЕННЯ ФЕРМЕНТУ ГІАЛУРОНІДАЗИ З ТВАРИННОЇ ТКАНИНИ ПРИ РІЗНИХ УМОВАХ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРО- ЦЕСУ. ПРИГОТУВАННЯ СУБСТРАТУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГІАЛУРОНІДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ І ВИЗНАЧЕННЯ ЇЇ В ОТ- РИМАНОМУ ЕКСТРАКТІ

Приготування розчинів:

*1. Приготування 1% розчину альбуміну сироваткового бичачого або лю-
дини.*

У мірній колбі місткістю 25 мл розчиняють 0,25 г сироваткового альбумі-
ну Р 15 мл води, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. Розчин
використовують свіжоприготованим.

2. Приготування 15% розчину оцтової кислоти.

У конічну колбу місткістю 100 мл поміщають 15 мл оцтової кислоти
(ДФУ 1000401), додають 50 мл води і перемішують. Розчин доводять водою до
об'єму 100 мл. Термін придатності розчину становить 1 місяць.

3. Приготування розчину гіалуронідази.

Сім'яники великої рогатої худоби звільняють від оболонок і подрібнюють
гомогенізацією. Подрібнену тканину (200 г) поміщають у дві ємності (по 100 г)
і в кожну додають по 150 мл води (співвідношення тканина : вода – 1 : 1,5). Су-
міш перемішують, за допомогою оцтової кислоти доводять величину рН до
 $4,5 \pm 0,2$ (1-я ємність) і до $5,5 \pm 0,2$ (2-я ємність). Суміш перемішують протягом 2–
3 годин, відбирають по 20 мл суміші (1-ша і 2-га проба), піддають фільтрації
через паперовий фільтр або центрифугують при 2000 об./хв протягом 20 хви-
лин. Частину суміші, що залишилася, продовжують екстрагувати протягом 2–
3 годин, відбирають по 20 мл суміші (3-тя і 4-та проба), піддають фільтрації че-
рез паперовий фільтр або центрифугують при 2000 об./хв протягом 20 хвилин.
Надосадна рідина містить фермент гіалуронідазу. Отримані 4 проби екстрактів,
що відрізняються часом екстракції і величиною рН, містять гіалуронідазу.

4. Приготування субстрату. Пупкові канатики людини (пуповина) зби-
рають в ацетон, звільняють від судин і крові, знову поміщають в нову порцію
ацетону і зберігають при температурі 4 ± 2 °С не більше 3 місяців. При необхід-
ності канатики витягують з ацетону, поміщають між двома смужками фільтру-
вального паперу і залишають на повітрі до повного видалення слідів ацетону.

Потім канатики подрібнюють на шматочки близько 1 мм, зважують і заливають водою (на 1 г тканини – 10 мл води).

Отримана суміш набухає при кімнатній температурі від 30 до 40 хвилин, потім масу нагрівають на слабкому вогні при постійному перемішуванні і кип'ятять протягом 2 хвилин. Розчин фільтрують у гарячому вигляді через ватяний фільтр. Фільтрат зберігають при температурі 4 ± 2 °C не більше 2 діб. Для роботи використовують субстрат з відносною в'язкістю 4,0–4,5 при температурі 24 ± 1 °C. Відносну в'язкість визначають за допомогою капілярного віскозиметра. У день визначення гіалуронідазної активності в'язкість доводять водою до потрібного значення.

5. Визначення робочої дози субстрату. За 0,5 мл води поміщають у дві пробірки. Потім у 1-шу пробірку поміщають 0,1 мл субстрату, у 2-гу пробірку – 0,2 мл субстрату, потім в кожную пробірку додають по 0,05 мл 1% розчину бичачого сироваткового альбуміну, перемішують і додають 0,1 мл 15 % розчину оцтової кислоти. За робочу дозу приймають мінімальну кількість субстрату, що утворює чітко оформлений муциновий згусток. При відсутності згустку – субстрат бракують. Робочу дозу встановлюють перед початком досліду.

Хід роботи

По 0,5 мл води поміщають у 6 пробірок. У першу пробірку додають 0,5 мл отриманого розчину препарату, вміст пробірки ретельно перемішують і переносять 0,5 мл суміші з першої пробірки у другу і т.д. Таким чином, отримують розведення препарату від 1: 2 до 1: 64.

В кожную пробірку поміщають робочу дозу субстрату, перемішують і пробірки витримують на водяній бані при температурі $37 \pm 0,5$ °C протягом 20 хвилин. Потім пробірки охолоджують протягом 3 хвилин у холодній водопровідній воді, у кожную додають по 0,05 мл 1% розчину альбуміну бичачого сироваткового і по 0,1 мл 15% розчину оцтової кислоти.

Гіалуронідазну активність препарату розраховують з розведення препарату в останній пробірці, де не утворився муциновий згусток за наведеною нижче шкалою.

Таблиця 3.2 – Шкала гіалуронідазну активності

Номер пробірки	1	2	3	4	5	6
Гіалуронідазна активність, Од.	2	4	8	16	32	64

Отримані дані внести в протокол дослідження (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Результати експерименту

№ проби	Температура екстракції, °C	pH при екстракції	Час екстракції, хв	Гіалуронідазна активність, Од.



Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте дію ферменту – гіалуронідази.
2. Опишіть методику приготування субстрату гіалуронової кислоти.
3. Поясніть вибір сім'яників як сировини для екстракції гіалуронідази.
4. Опишіть методику визначення гіалуронідазної активності.
5. Опишіть методику роботи з pH-метром.
6. З якою метою в медицині застосовують препарати, що містять гіалуронідазу?
7. Наведіть механізм гідролізу гіалуронової кислоти.
8. Чи існує залежність виходу ферменту гіалуронідази від pH в екстракційній суміші?
9. Чи існує залежність виходу ферменту гіалуронідази від часу екстракції?

Лабораторна робота 4. ВИДІЛЕННЯ ПЕКТИНОВИХ РЕЧОВИН ІЗ РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ ТА ЇХ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета роботи – виділення пектину і переведення його у розчинений стан; визначення вмісту пектину в продуктах.

Основні завдання:

1. Виділення пектину та його переведення у розчинений стан.
2. Визначення пектину кальцій-пектатним методом.
3. Визначення пектину етанольним методом.

Таблиця 4.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3
Обладнання та матеріали	1. Ваги аналітичні	+	+	+
	2. Плитка електрична	+	+	+
	3. Шафа сушильна (50–200 °C)		+	+
	4. Холодильник 4–8 °C	+		
	5. рН-метр	+	+	+
	6. Ступка порцелянова	+		
	7. Баня водяна (40 °C)	+		
	8. Баня водяна (100 °C)	+		
	9. Зворотний холодильник	+		
	10. Бюкси скляні		+	
	11. Тиглі			+
	12. Піпетки 5 мл, 10 мл	+	+	+
	13. Циліндри мірні	+	+	+
	14. Колби 250 мл і 500 мл	+		
	15. Конічні колби 150 мл і 250 мл	+		
	16. Воронки конусні	+	+	+
	17. Папір фільтрувальний	+	+	+
Сировина	1. Яблука	+		
Реактиви	1. Амоній лимоннокислий, Р	+		
	2. Оцтова кислота, Р		+	
	3. Кальцію хлорид, Р		+	

Закінчення таблиці 4.1

Реактиви	4. Срібло азотнокисле, Р		+	
	5. Спирт етиловий, Р			+
	6. Натр їдкий, Р		+	
	7. Кислота хлористоводнева, Р			+
	8. Вода очищена, Р	+	+	+
	9. 0,3 М розчин кислоти хлористоводневої	+		
	10. 1 %-вий розчин амонію лимоннокислого	+		
	11. 1 М розчин натрію гідроксиду		+	
	12. 1 М розчин оцтової кислоти		+	
	13. 11 %-вий розчин кальцію хлориду		+	
	14. 0,5 %-вий розчин кальцію хлориду		+	
	15. Розчин азотнокислого срібла, Р		+	



ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Пектин – (грец. *pectos* – затверділий, застиглий) – природний полімер D-галактуронової кислоти з молекулярною масою 30 000–100 000. Пектин міститься у рослинній сировині, плодах, овочах, коренеплодах, належить до розчинних харчових волокон. Пектини були відкриті в 1825 році.

Молекули пектину – це ланцюжки пектинової кислоти (рамногалактуронан), які містять 20 і більше залишків галактуронової кислоти, частково метоксильованої, частково нейтралізованої. Кількість заміщених карбоксильних груп визначає ступінь етерифікації пектину. Якщо більше 50% карбоксильних груп містять залишки етилового спирту – це високоетерифіковані (високометоксильовані) пектини, якщо ступінь етерифікації нижче 50% – це низькоетерифіковані (низькометоксильовані) пектини. Пектин утворюється з протопектину під дією кислот, лугів або ферменту протопектинази.

Ланцюг пектинової кислоти складається з рамнози і залишків молекул галактуронових та полігалактуронових кислот, карбоксильні групи яких частково етерифіковані метиловим спиртом. До головного ланцюга ковалентними зв'язками приєднуються бічні ланцюга геміцелюлоз – галактанів і арабінанів. Солі пектинової кислоти називаються пектинати. На рис. 3.1 показаний фрагмент структурної формули пектинової кислоти.

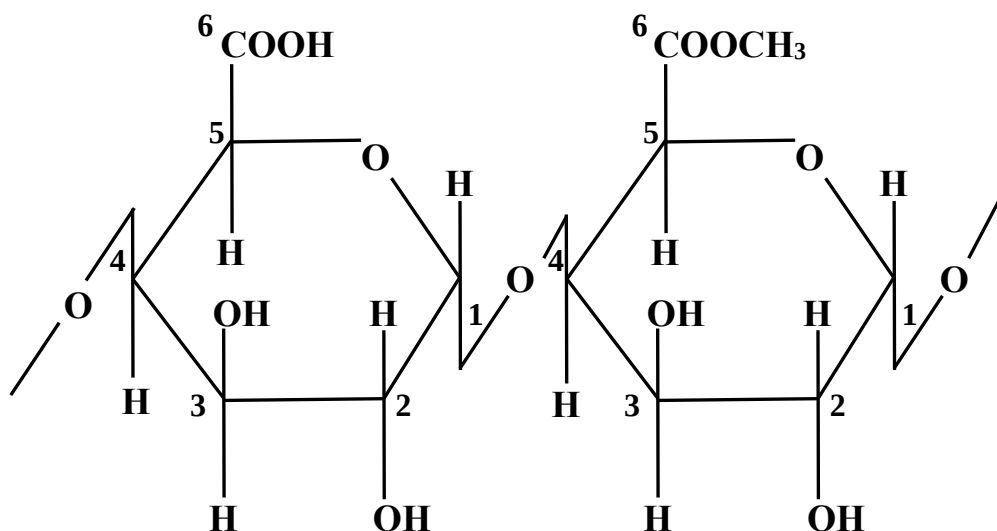


Рисунок 3.1 – Фрагмент структурної формули пектинової кислоти

Карбоксильні групи галактуранової кислоти часто утворюють метилові ефіри. Омиленням складноефірних груп отримують пектові кислоти, які не містять нейтральних моносахаридів. Солі пектової кислоти називаються пектати.

Пектин одержують з відходів виробництва фруктових соків (яблучного, лимонного апельсинового, мандаринового), іноді – з відходів виробництва бурякового цукру або соняшникової олії шляхом екстракції при нагріванні зазвичай з розчином фосфорної кислоти або іншої мінеральної кислоти. Екстракт концентрують, фільтрують і осаджують пектинові речовини спиртом. Для очищення пектину використовують його властивості утворювати пектинати з металами. Вміст пектину в білій частині шкіри цитрусових досягає 25–30%, в шкірці яблук – 40%, а в жомі – 10–20% сухої маси.

Пектини використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловості як гелеутворювачі, адсорбенти, емульгатори, як компоненти полімерних терапевтичних систем з контрольованим вивільненням діючих речовин. Пектини мають здатність пролонгувати дію ліків. Для пектинів характерні адсорбційні, гастропротекторні, гіпохолестеринемічні властивості. Добова потреба в пектинових речовинах в раціоні дорослої людини становить 5–6 г. Низькоетерифіковані та амідовані пектини використовують як загусники і стабілізатори консистенції кисломолочних продуктів, молочних десертів, напоїв, кетчупів. З додаванням пектинів виготовляють термостабільні фруктові начинки.

Пектини є компонентом природних харчових продуктів, які не перетравлюються, не вбираються і не розщеплюються мікрофлорою кишечника. Низь-

кометильований пектин сприяє виведенню з організму важких металів і радіонуклідів завдяки високій здатності до комплексоутворення.



Завдання 1.

ВИДІЛЕННЯ ПЕКТИНУ І ПЕРЕВЕДЕННЯ ЙОГО В РОЗЧИ- НЕНИЙ СТАН

Приготування розчинів:

1. *0,3 М розчин хлористоводневої кислоти.* 30,9 г кислоти хлористоводневої доводять водою до об'єму 100 мл.
2. *1% розчин амонію лимоннокислого.* 1 г амонію лимоннокислого доводять водою до об'єму 100 мл.
3. *1 М розчин натрію гідроксиду.* 4 г натрію гідроксиду розчиняють у воді і доводять водою до об'єму 100 мл.
4. *1 М розчин оцтової кислоти.* 6 г оцтової кислоти льодяної розводять водою до об'єму 100 мл.
5. *11 %-вий розчин кальцію хлориду.* 11 г кальцію хлориду в перерахунку на безводну речовину розчиняють у воді і доводять водою до об'єму 100 мл.
6. *0,2% спиртовий розчин карбазолового реактиву.* 0,2 г карбазолу доводять спиртом етиловим до 100 г.

Хід роботи

Наважку яблук масою 25 г вологого або 10 г сухого досліджуваного матеріалу ретельно розтирають у ступці до однорідної маси. Кількісно переносять в конічну колбу на 150 мл, змиваючи ступку водою, потім додають в колбу 100 мл води температурою 40 °С. Колбу з матеріалом витримують на водяній бані при температурі 40 °С протягом 30 хвилин. Після цього вміст колби фільтрують через паперовий складчастий фільтр. Операцію повторюють, заливаючи твердий залишок в колбі 75 мл, а потім ще раз 50 мл води. Отримані екстракти збирають в мірну колбу на 250 мл і доводять водою до мітки. Отриманий розчин гідратопектинів використовують для подальших аналізів.

Для визначення масової частки в рослинній сировині протопектина і пектової кислоти залишок на фільтрі подрібненого рослинного матеріалу заливають 50 мл 0,3 М розчину кислоти хлористоводневої і переносять у конічну колбу на 250 мл, закривають колбу пробкою зі зворотним холодильником і витримують 30 хвилин на киплячій водяній бані. Потім екстракт фільтрують через

складчастий паперовий фільтр в мірну колбу на 500 мл. Залишок на фільтрі 3–4 рази промивають 75 мл води. Промивні води фільтрують через паперовий фільтр у ту ж колбу. Фільтр разом із залишком рослинного матеріалу переносять у конічну колбу, заливають 60 мл 1 %-вого розчину лимоннокислого амонію і поміщають на киплячу водяну баню на 30 хвилин. Отриманий екстракт фільтрують через паперовий фільтр у ту ж колбу. Фільтр промивають гарячою водою, і об'єм доводять водою до мітки 500 мл.

Отримані екстракти гідратопектину і протопектину досліджують одним з наступних методів.



Завдання 2.

ВИЗНАЧЕННЯ ПЕКТИНУ КАЛЬЦІЙ-ПЕКТАТНИМ МЕТОДОМ

Метод заснований на осадженні пектових кислот у вигляді кальцієвих солей. Залежно від мети дослідження можна визначити окремо розчинний пектин, протопектин і суму пектинових речовин. Хід аналізу при визначенні пектинів в обох розчинах однаковий. Відмінність у тому, що розчин протопектина попередньо нейтралізують NaOH до додавання луку, необхідного для його гідролізу.

Хід роботи

Для гідролізу пектинових речовин до 50 мл досліджуваного розчину додають рівний об'єм 1 М розчину натрію гідроксиду і залишають на 8–10 годин при кімнатній температурі. Після закінчення цього часу розчин підкислюють тим же об'ємом 1 М оцтової кислоти. Утворені при цьому пектові кислоти осаджують 50 мл 11 %-вого розчину кальцію хлориду. Отриманий осад пектату кальцію відфільтровують через заздалегідь висушений до постійної маси і зважений у бюксі паперовий фільтр. Осад на фільтрі промивають 0,5 %-вим розчином кальцію хлориду, а потім 5–6 разів холодною (4–6 °C) водою для видалення іонів хлору (перевірка по реакції на іони хлору з азотнокислим сріблом). Для зниження зольності осад додатково промивають 3–4 рази гарячою (70–80 °C) водою. Фільтр з осадом переносять у бюкс і сушать до постійної маси при температурі 100–105 °C.

Масу осаду, отриману по різниці між масою бюкса з осадом на фільтрі і масою бюкса з фільтром, множать на 0,9235 для перерахунку на пектову кислоту.

Похибка методу складає 0,3 %.

Джерела помилок: можливість переходу в осад пектати кальцію не пектинових домішок.



Завдання 3.

ВИЗНАЧЕННЯ ПЕКТИНУ ЕТАНОЛЬНИМ МЕТОДОМ

Хід роботи

До 50 мл досліджуваного розчину додають концентровану хлористоводневу кислоту до її кінцевої концентрації 0,15 М. Потім при постійному енергійному перемішуванні вводять по краплях 100 мл 95 %-вого етилового спирту. Через 1 годину отриманий осад відфільтровують через паперовий складчастий фільтр, ретельно промивають сумішшю вода : етанол у співвідношенні 1 : 2, що містить 0,2 % соляної кислоти. Промитий осад розчиняють на фільтрі гарячою водою. При поганій розчинності осаду до гарячої води додають кілька крапель лугу. Кількість фільтрату має бути рівним 50 мл. Отриманий фільтрат нейтралізують і знову осаджують етиловим спиртом. Осад знову фільтрують, промивають спочатку сумішшю вода : етанол у співвідношенні 1 : 2, потім 95 %-вим етиловим спиртом, переносять кількісно гарячою водою в попередньо висушений до постійної маси і зважений тигель і сушать до постійної маси при температурі 100–105 °С.

Різниця між масою тигля з осадом після сушки і порожнього тигля є кількість пектину в 50 мл розчину.



Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте властивості пектинових речовин.
2. Які сировинні джерела для виділення пектинових речовин Вам відомі?
3. У яких галузях промисловості знайшли використання пектини, і на яких властивостях ґрунтується їх дія?
4. Опишіть метод виділення пектинів.
5. Охарактеризуйте визначення пектину кальцій-пектатним методом.
6. Охарактеризуйте визначення пектину етанольним методом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Основы лабораторных исследований: практикум. / Ю. М. Краснопольский, Л. В. Северина. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2017. – 208 с.
2. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю. М. Краснопольский, А.С. Дудниченко, В.И. Шве́ц. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 227 с.
3. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть I / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 303 с.
4. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. Часть II. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2013. – 192 с.
5. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Аспекты фармацевтической химии. / Ю. М. Краснопольский, О. В. Звягинцева. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2018. – 248 с.
6. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
7. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.
8. Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни Основи технічної мікробіології / уклад. С.С. Ставська, І.О. Кривець, В.В. Вембер. – Київ : НТУУ «КПІ», 2007. – 40 с.
9. Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології для студентів напрямку підготовки 6091501 «Харчові технології та інженерія» / уклад. О.В. Ващенко. – Харків : НТУ «ХПІ», 2008. – 72 с.
10. Чипинский Е.В. Разработка оптимальной технологической линии производства гиалуронидазы с использованием микробиологического синтеза / Е.В. Чипинский // Научное обозрение. Педагогические науки. – 2019. – № 2–4. – С. 106–109.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Лабораторна робота 1. Приготування та контроль якості поживних середовищ для вирощування штамів пробіотиків.....	4
Контрольні запитання.....	17
Лабораторна робота 2. Вирощування штамів мікроорганізмів (пробіотиків) та контроль отриманих продуктів.....	18
Контрольні запитання.....	34
Лабораторна робота 3. Виділення ферменту гіалуронідази і визначення її біологічної активності.....	35
Контрольні запитання.....	41
Лабораторна робота 4. Виділення пектинових речовин із рослинного матеріалу та їх дослідження.....	42
Контрольні запитання.....	47
Список літератури.....	48

Навчальне видання

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт
з курсу «Біотехнологія фармакологічно активних інгредієнтів»
для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Укладачі: КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович
ПИЛИПЕНКО Дар'я Михайлівна

Відповідальний за випуск проф. Близнюк О. М.
Роботу до видання рекомендував проф. Циганков О. В.
В авторській редакції

План 2021 р., поз. 241.

Підп. до друку 28.10.21. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний.

Друк – ризографія. Гарнітура Times New Roman. Ум. друк. арк. 3,0.

Наклад 50 прим. Зам. № 3016. Ціна договірна.

Видавничий центр НТУ «ХПІ».

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 5478 від 21.08.2017 р.
61002, Харків, вул. Кирпичова, 2

Віддруковано ТОВ «Друкарня Мадрид»
61024, м. Харків, вул. Максиміліанівська, 11. Тел.: 0800 33 67 62
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи Серія ДК № 4399 від 27.08.2012 р.
www.madrid.in.ua info@madrid.in.ua