

ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ЛАКТОБАЦИЛ

В. В. Черепанський, Н. М. Грегірчак

Національний університет харчових технологій

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені досить широко. Однак препарати зарубіжного виробництва займають майже весь ринок, тому виробництво вітчизняних пробіотиків є актуальним завданням, адже їхньою важливою перевагою є адаптивність штамів мікроорганізмів до української популяції населення.

Для виробництва ефективних та якісних пробіотичних препаратів необхідним є ретельний вибір усіх технологічних операцій, які б забезпечили отримання максимальної кількості життєздатних і стабільних при тривалому зберіганні клітин бактерій. Під час розробки процесу виробництва препарату особлива увага приділяється розумінню виробничих етапів, пов'язаних з виробництвом пробіотиків у комерційних масштабах. Кожен етап процесу залежить від попереднього етапу, тому важливо проаналізувати та визначити можливі негативні фактори, що можуть вплинути на клітини бактерій, і намагатися підтримувати загальну кількість життєздатних клітин, продовжуючи процес виробництва на наступних етапах.

Найбільш оптимальна технологічна схема виробництва пробіотичного препарату включає: стадію культивування, відокремлення біомаси від культуральної рідини, стадію додавання захисного середовища до отриманої біомаси, стадію сушіння, подрібнення та просіювання висушеної біомаси, стадію фасування, пакування та маркування цільового продукту.

Аналіз даних показав, що на стадії відокремлення біомаси найбільш ефективним є застосування методу сепарування, на стадії сушіння — методу ліофільного висушування, а на стадії подрібнення — методу, який передбачає використання вальцевої дробарки. При аналізі різних комбінацій захисних середовищ, що використовуються на стадії стабілізації біомаси бактерій, найбільш ефективним визначено середовище, що містить сухе знежирене молоко (6%), сахарозу (8%) та желатин (4%). Таке захисне середовище додається у співвідношенні 2:1 (біомаса бактерій:захисне середовище). На стадії пакування найбільш ефективною первинною упаковкою обрано багатошаровий пакетик-саше.

Слід відмітити, що обладнання, яке використовується при проведенні виробничих процесів, та умови, в яких проводяться ці процеси, повинні обов'язково відповідати вимогам GMP, адже в сучасних умовах виробництво конкурентоспроможних препаратів з найвищою якістю без дотримання вимог неможливе.

Ключові слова: вітчизняні пробіотики, лактобацили, технологічний процес.

Постановка проблеми. Для того, щоб пробіотичний препарат позитивно впливав на організм людини, необхідним є забезпечення відповідної кількості життєздатних клітин, що зазначена на упаковці, та їхньої стабільності протягом

усього терміну зберігання. Оскільки клітини пробіотичних мікроорганізмів, зокрема лактобацили, є дуже чутливими до дії зовнішніх факторів (температура, кисень, механічний вплив тощо) [1; 2], питання правильного вибору технологічних етапів виробництва є досить важливим. Адже від того, яка саме технологічна операція введена у виробничий процес, залежить якість та ефективність препарату на виході.

Не менш важливим є вибір методики проведення технологічного процесу тому, що саме від того, як буде проводитись операція, залежить не тільки кількість готового препарату в кінці виробничого циклу, а й ступінь впливу зовнішніх факторів на бактеріальні клітини.

Метою статті є обґрунтування оптимальних технологічних етапів виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил і методик їх проведення задля збереження максимальної кількості живих клітин.

Викладення основних результатів дослідження. На відміну від звичайних лікарських засобів, виготовлення пробіотичних препаратів пов'язане з культивуванням мікроорганізмів, які виступають у ролі активного фармацевтичного інгредієнта (далі АФІ) [3]. У зв'язку з цим технологічний процес виробництва препарату розпочинається з отримання біомаси пробіотичних бактерій, зокрема процесу культивування.

Пробіотичні препарати містять живі клітини мікроорганізмів, адаптовані до певних умов існування, тому досить сильно реагують на їхню зміну. Симбіотична мікрофлора людей, які проживають у регіонах з різними кліматичними умовами, раціонами харчування, не є абсолютно однаковою, тому при розробці препарату слід враховувати тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом.

Найбільш високу ефективність проявляють пробіотики, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів, тому принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення [4]. Порівняльний аналіз штамів *L. plantarum*, які можуть бути використанні для виготовлення пробіотичного препарату, наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Особливості одержання пробіотику за використання різних штамів *L. plantarum*

Штам молочнокислих бактерій	Середовище для культивування, г/л	Тривалість культивування	Концентрація клітин, КУО/мл	Література
1	2	3	4	5
<i>L. plantarum</i> 38	1. Дріжджовий екстракт — 5,0; 2. М'ясний екстракт — 10,0; 3. Гідролізат казеїну — 10,0; 4. Глюкоза — 20,0; 5. Твін 80 — 1,0; 6. Ацетат натрію — 5,0; 7. Цитрат амонію — 2,0;	24	1,5·10 ⁸	[5]
<i>L. plantarum</i> 337Д УКМ В-2627	8. K ₂ HPO ₄ — 2,0; 9. MgSO ₄ ·7H ₂ O — 0,2; 10. MnSO ₄ ·4H ₂ O — 0,05.		1·10 ⁹	[6]

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5
<i>L. plantarum</i> T5jq301796.1	11. Глюкоза — 25,96; 12. Дріжджовий екстракт — 18,4; 13. Na ₃ PO ₄ — 0,2; 14. K ₂ HPO ₄ — 0,2; 15. MgSO ₄ ·7H ₂ O — 0,01; 16. Твін 80 — 1,0; 17. Вітамінний розчин — 1,0 мл	24	1,25·10 ¹⁰	[7]

Попри високу продуктивність штаму *L. plantarum* T5jq301796, його використання є доволі небезпечним, адже штам є генномодифікованим [7]. У зв'язку з цим існує ризик переносу генів між лактобактеріями та біфідобактеріями, які населяють травний тракт, і можливість генетичних штамів молочнокислих бактерій змінити всю мікробну екологію травного тракту непередбачуваним чином [8]. Також ризик використання ГМ-пробіотиків пов'язаний зі стійкістю та поширенням цих інженерних пробіотиків у зовнішньому середовищі, що спричинить непередбачувані зміни в ньому [9].

Для виготовлення вітчизняного пробіотику пропонується використовувати штам *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України (УКМ). Цей штам виділено із шлунково-кишкового тракту людей-довгожителів у 1978—1981 рр. під час міжнародної геронтологічної експедиції до високогірних селищ Абхазії — регіону з високим рівнем довголіття. Штам володіє пробіотичними властивостями та характеризується високою біологічною активністю [6].

На етапах культивування необхідним є підбір оптимального складу поживного середовища та умов проведення процесу культивування (температури, рН, відсутність кисню, тривалість культивування тощо), адже від цього залежить рівень біомаси та кількість живих клітин у кінці етапу. Бактерії роду *Lactobacillus* відносяться до мікроорганізмів, які мають складні потреби у поживних речовинах. Для їхнього активного розвитку потрібна наявність речовин, необхідних для побудови бактеріальної клітини (нуклеїнових кислот, полісахаридів, аміноцукрів тощо). Також для росту молочнокислих бактерій необхідні органічні форми азоту, які вони самі не синтезують. Багатьом видам лактобацил для розвитку необхідні вітаміни. Цим пояснюється значний вплив на їхній ріст додавання до живильного середовища різних екстрактів (наприклад, дріжджового, кукурудзяного), а також інших сполук. З численних поживних середовищ, що застосовуються при культивуванні молочнокислих бактерій, найкращими є ті, що збалансовані за азотним, вуглеводним та вітамінним складом і містять всі необхідні поживні та стимулюючі речовини у формі, що легко засвоюється мікроорганізмами [1].

Для штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 оптимальним поживним середовищем для культивування є середовище MRS, адже це середовище багате на поживні речовини і ростові фактори: містить дріжджовий і м'ясний екстракти, глюкозу, пептон, ацетат натрію, цитрат амонію і твін-80 — джерело жирних кислот, необхідних для метаболізму лактобактерій. Тривалість культивування штаму складає 24 год; температура, за якої здійснюється культивування, становить 37°C; оптимальне значення рН — 7,0 [6].

Після процесу біосинтезу, отримана культуральна рідина складається із залишків компонентів поживного середовища, метаболітів і біомаси молочнокислих бактерій. З огляду на це необхідним етапом є відокремлення біомаси від культуральної рідини, адже залишки компонентів поживного середовища та метаболіти можуть погіршити якість готового препарату.

Стадії збору як для видалення клітин або клітинних компонентів, так і для збору клітинних компонентів після руйнування слід здійснювати за допомогою обладнання та в зонах, призначених для зведення до мінімуму ризику контамінації.

Обладнання для процесу відділення біомаси має бути сконструйоване таким чином, щоб поверхні, які контактують із сировиною, не змінювали характеристики АФІ понад межі, встановлені в офіційних або інших специфікаціях. Також, зокрема при виробництві пробіотичного препарату, обладнання повинно мінімально впливати на активність, цілісність клітин і кількісний склад бактерій, які підлягають відділенню від культуральної рідини [10].

На сьогодні застосовуються такі методи відокремлення біомаси бактерій від культуральної рідини: фільтрація, флотація, центрифугування та сепарація.

Таблиця 2. Порівняльна характеристика різних методів відділення біомаси

Назва методу	Принцип відділення	Переваги використання	Недоліки використання	Література
1	2	3	4	5
<i>Фільтрація</i>	Процес відділення твердої фази від рідкої здійснюється шляхом проходження суспензії через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів	С менш енергоємним	Великі втрати біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу	[11]
<i>Флотація</i>	Виділення з рідких середовищ твердих часток або часток іншої рідини здійснюється за допомогою продування крізь неї газу	Економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах	Великі втрати біомаси	[12]
<i>Центрифугування</i>	Процес розділення суспензій на рідку і тверду фази здійснюється під дією відцентрових сил, при цьому суспензія проходить через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази	Можливість автоматизувати процес. Спостерігаються менші втрати біомаси порівняно з фільтрацією та флотацією	Менша ефективність порівняно із сепаруванням	[13]
<i>Сепарування</i>	Процес розділення суспензій на рідку і тверду фази здійснюється під дією відцентрових сил, при цьому суспензія проходить через міжтарілчастий простір сепаратора	Можливість автоматизувати процес. Спостерігаються менші втрати біомаси порівняно із фільтрацією та флотацією, більша ефективність порівняно з центрифугуванням	Порівняно вищий механічний вплив на клітини	[14]

Аналіз даних (табл. 2) показав, що найбільш ефективним методом відокремлення біомаси від культуральної рідини є метод сепарування. Перевагами методу сепарування є:

- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;
- можливість автоматизувати процес;
- більша ефективність порівняно з центрифугуванням.

Важливим етапом технологічного процесу виробництва пробіотичних препаратів є стабілізація біомаси бактерій після процесу відділення від культуральної рідини з метою захисту клітин від значних змін в їхній структурі на наступних етапах, що можуть супроводжуватись руйнуванням клітин і втраченою життєздатності. При цьому забезпечується стабільність клітин не тільки з точки зору життєздатності, але й з точки зору метаболічної та функціональної активності для підтримки бажаних сенсорних властивостей і забезпечення заявленої користі пробіотичних препаратів для здоров'я протягом усього терміну зберігання [15].

У промисловості найчастіше для стабілізації біомаси застосовують комбіновані захисні середовища, що містять сахарозу, лактозу, цитрат, глютамат натрію, знежирене молоко, сироватку з додаванням різних вуглеводів, багатомінеральних спиртів і солей. Захисні середовища запобігають пошкодженню клітин під час наступних етапів виробництва, зокрема процесу сушіння. Оскільки кінцевою формою препарату є висушений порошок, клітини необхідно захистити від впливу низьких і високих температур у процесі сушіння. Кріопротектори та ліопротектори (речовини, які входять до захисного середовища) уповільнюють швидкість росту льоду за рахунок збільшення в'язкості розчину та стабілізують ліпідну двошарову структуру клітинної мембрани за відсутності води [16].

Біомасу також стабілізують нетрадиційними способами, наприклад, іммобілізацією клітин у гелі гідроксиду алюмінію та ацетилфталіцилцелюлози. Цей технологічний спосіб забезпечує високий ступінь життєздатності мікроорганізмів під час зберігання і дає змогу вилучити з технологічного процесу сублімацію, що значно скорочує енергетичні та економічні витрати. Недоліком цього способу є можливість обробки невеликих кількостей утвореної культуральної рідини та достатньо складна організація процесу [17].

Аналіз способів стабілізації біомаси бактерій підтвердив, що найбільш економічно доцільним і дієвим є додавання захисного середовища, яке містить кріо- та ліопротектори.

Дисахариди, такі як сахароза і трегалоза, є прекрасними ліопротекторами. Позитивний вплив цукрів під час процесу сушіння полягає в тому, що в гідратованому стані конформація та цілісність білків і мембран стабілізується взаємодією з молекулами води, головним чином за рахунок водневого зв'язку. Після видалення води полярні групи цукрів можуть замінити молекули води. Полярні головні групи мембрани можуть безпосередньо взаємодіяти з ОН-залишками сахариду за допомогою водневого зв'язку. Оскільки в процесі дегідратації залишається достатньо місця між головними групами, цілісність мембрани може бути збережена після регідратації [18].

Добавки, що утворюють матрицю, і часто називаються допоміжними речовинами, включають манітол, сироватку та знежирене молоко. Найчастіше

використовують знежирене молоко, тому що при його використанні залишається значно більша кількість живих клітин порівняно з іншими компонентами як після процесу сушки, так і при зберіганні. Додатковим компонентом є також білок, який може бути як рослинного походження (наприклад, соєвий пептон), так і тваринного (наприклад, желатин). Найбільш застосовуваним є желатин — білковий продукт тваринного походження, який являє собою суміш лінійних поліпептидів з різною молекулярною масою. Виявлено, що білок як захисний компонент має великий вплив на виживання пробіотику [19]. Білок здатний запобігати пошкодженню клітин, утворюючи на клітинній стінці захисне покриття. Він здатний діяти як неактивний заповнювач, утворюючи навколо клітин захисне покриття і знижуючи ймовірність того, що велика кількість клітин злипнеться між собою. Тому для захисту клітин пробіотиків пропонується універсальне захисне середовище, яке включає всі необхідні компоненти (сахарозу, сухе знежирене молоко). Для додаткового захисту застосовується желатин, адже в комплексі вони забезпечують збереження достатньої кількості життєздатних клітин.

Кінцевою формою препарату, який розробляється, є сухий порошок, оскільки при його використанні стабільність та якість препарату майже не змінюється впродовж усього терміну зберігання. Для отримання порошкоподібних препаратів можуть застосовуватися такі методи: сушіння за допомогою розпилювальної сушарки, вакуумна сушка та сублімаційна сушка (ліофілізація) [21].

Обладнання, яке використовується для сушіння, повинно мінімально впливати на якість АФІ, зокрема забезпечувати максимально можливу кількість живих і непошкоджених клітин пробіотичних бактерій [10].

Таблиця 3. Залежність виживання клітин від методу сушіння та способу їх захисту

Метод сушіння	Спосіб підвищення життєздатності	Культура мікроорганізмів	Життєздатність клітин без застосування способу, %	Життєздатність клітин із застосуванням способу, %	Література
1	2	3	4	5	6
Розпилювальна сушка	Встановлення температури на вході 135°C та температури на виході 65°C	<i>L. rhamnosus</i> GG та <i>L. rhamnosus</i> RBM 526	12,7 8,0	56,53 52,63	[22]
	Використання азоту замість повітря	<i>L. lactis subsp. cremoris</i> ASCC930119	45,19	58,58	[23]
	Слабке осмотичне навантаження (NaCl, 30 хв) перед сушінням	<i>L. paracasei</i> NFBC	8,27	33,46	[24]
	Попередня обробка теплом (52°C, 15 хв)	<i>L. plantarum</i> 8329	4,3	24	[25]

1	2	3	4	5	6
Сублімаційна сушка	Додавання до середовища сахарози або трегалози (10% (мас./об.))	<i>L. helveticus</i>	10	50	[26]
	Додавання до середовища знежиреного молока та трегалози (співвідношення 6% та 8% (мас./об.) відповідно)	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> DSM 20081	3	70	[27]
	Зниження температури заморожування	<i>L. brevis</i> (з -20°C до -60°C)	46,4	65,2	[28]
		<i>L. salivarius</i> I 24 (з -30°C до -80°C)	44,35	65	[29]
Вакуумна сушка	Додавання до середовища трегалози або сорбіту (25% (мас./об.))	<i>L. paracasei</i> F19	29	54	[30]
	Застосовування коротшого часу висихання	<i>L. plantarum</i> CIF17AN2	18,9	37,9	[31]
	Додавання до середовища сорбіту	<i>L. helveticus</i> WS1032	15,4	29,5	[32]

Аналіз даних (табл. 3) показав, що найбільш ефективним методом сушіння біомаси бактерій є метод ліофілізації. Перевагами ліофілізації, порівняно з вакуумною та розпилювальною сушаркою, є:

- живі клітини, які поступають на ліофілізацію, не інактивуються в процесі;
- збереження дисперсної фази препарату;
- висушений продукт можна зберігати досить тривалий термін;
- відсутність впливу високих температур.

Ліофілізація — найбільш зручний і широко застосовуваний спосіб видалення води для підвищення стабільності при зберіганні пробіотиків. Цей процес можна розділити на три етапи: заморожування, первинна сушка та вторинна сушка. Ліофілізовані тканини і препарати при зволоженні відновлюють свої первинні властивості. Недоліками ліофілізації є необхідність ретельної підготовки препарату до сушки, створення високого вакууму для повноти висихання, тривалість сушіння і досить високі енерговитрати. Ліофілізацію за-

стосовують при необхідності тривалого зберігання і консервування різних продуктів біологічного походження, для одержання сухої плазми донорської крові, сухих сироваток і вакцин, при трансплантації органів і тканин, у фармацевтичній і харчовій промисловості [33].

Технологічно та економічно доцільно перевірити обрану вище комбінацію захисного середовища для використання його у процесі ліофілізації та визначити його кількість, яку необхідно додати до бактеріальної біомаси. Було оцінено ефективність захисного середовища складу за різних концентрацій компонентів (табл. 4).

Таблиця 4. Компоненти кріозахисних середовищ, що використовуються для ліофільної сушки [14]

Номер середовища	Сухе знежирене молоко, % (мас./об.)	Сахароза, % (мас./об.)	Желатин, % (мас./об.)
1	0	0	0
2	6	0	0
3	6	0	2
4	6	4	2
5	6	4	4
6	6	8	2
7	6	8	4

Швидкість виживання обчислювали як загальну кількість бактерій після заморожування, поділену на загальну кількість бактерій до ліофільної сушки. У дослідженні використовувались такі співвідношення біомаси бактерій і захисного середовища — 2:1 та 5:1. У табл. 5 та 6 наведено ступінь виживання бактерій після ліофілізації за різної комбінації і концентрації компонентів захисного середовища та різному співвідношенні КР/ЗС [20].

Згідно з наведеними у табл. 4 даними, відмічено, що при висушуванні клітин лише у воді та за відсутності будь-якої кріопротекторної речовини виживаність становила лише 2—3%, а популяція бактерій значно зменшилась. Додавання 6% знежиреного молока до середовища збільшувало життєздатність бактерій до 20%.

Таблиця 5. Частота виживання *L. plantarum* після ліофільної сушки і трьох місяців зберігання при 4°C та 23°C (співвідношення 2:1) [20]

Номер середовища	Рівень виживання, %		
	Після сублимаційного сушіння	Зберігання при 4°C	Зберігання при 23°C
1	3	0,008	0,005
2	20	17	9
3	19	54	19
4	63	68	26
5	63	70	28
6	81	73	33
7	82	76	37

Таблиця 6. Частота виживання *L. plantarum* після ліофільної сушки і трьох місяців зберігання при 4°C та 23°C (співвідношення 5:1) [20]

Номер середовища	Рівень виживання, %		
	Після сублимаційного сушіння	Зберігання при 4°C	Зберігання при 23°C
1	2	0.01	0.01
2	18	21	12
3	18	48	15
4	56	65	20
5	58	67	24
6	72	68	33
7	74	72	35

Мікроорганізми демонстрували більш високий рівень виживання, коли до середовища додавали сахарозу. Середовище, що містить 8% сахарози, виявило більший ефект, ніж з вмістом 4%. Відсоток виживання близько 17—19% був виявлений у середовищах, що містять желатин і знежирене молоко, що вказує на те, що желатин у концентрації 2% не виявляв захисного ефекту під час заморожування. При ліофілізації із захисним середовищем, що містило 8% сахарози та 2% желатину, виживаність мікроорганізмів була подібною.

Після тримісячного зберігання ліофілізованих порошоків бактерій були перераховані живі клітини в кожному захисному середовищі. Результати, наведені в табл. 5 і 6, показали, що наприкінці цього періоду мікробна популяція зменшилася на один порядок при зберіганні за температури 23°C або 4°C. Коефіцієнт зниження початкової популяції пробіотиків був значним у всіх середовищах при зберіганні при 23°C. Желатин діяв як захисна речовина та покращував виживання бактерій. Поєднання 8% сахарози та 6% знежиреного молока виявило менший кріопротекторний ефект, ніж комбінація 6% знежиреного молока, 4% сахарози та 4% желатину. Ці дані показують, що підвищення концентрації сахарози з 4% до 8% без желатину збільшувало ступінь виживання після сушіння ліофілізацією, але не після зберігання. Клітини лактобактерій зберігали більшу життєздатність при більш високій концентрації желатину. Відсоток виживання близько 76% був виявлений у середовищі, що містить 6% знежиреного молока, 4% желатину та 8% сахарози. Тому цей варіант середовища є найбільш ефективним серед випробуваних кріопротекторних комбінацій [20].

Із наведених даних можна зробити висновок, що оптимальним співвідношенням біомаси бактерій до захисного середовища є 2:1. Про це свідчить більша кількість життєздатних клітин після процесу сушіння. Після сушіння біомаси бактерій, до якої попередньо було внесене захисне середовище, вона має вигляд суцільного твердого коржа, що містить 2—4% води. Тому необхідною технологічною операцією є подрібнення таких коржів з метою отримання тонкодисперсного стійкого порошку [34].

Для процесу подрібнення слід використовувати закриті обладнання або обладнання, що герметично закривається. Поверхні, що контактують з АФІ, не повинні впливати на якість продукту. Під час процесу подрібнення об-

ладнання повинно забезпечувати розмір часток у межах передбачених документацією [10].

Подрібненням називають процес поділу твердого (або умовно твердого) матеріалу на частинки, який здійснюється шляхом механічного впливу. Вибір способу подрібнення залежить від фізичних властивостей і розмірів матеріалу. Основне значення має міцність матеріалу. Тверді та крихкі матеріали типу кристалів цукру або сухого зерна можна подрібнювати розбиванням або розтиранням. Пластичні матеріали необхідно кутерувати.

Основні машини для подрібнення, залежно від конструктивних особливостей, поділяються на такі типи: дробарки щоккові, конусні, валкові, молоткові, барабанні; бігуни та кульові, стрижневі, вібраційні, колодні млини тощо. До всіх машин для подрібнення можна сформулювати такі загальні вимоги: рівномірність шматків подрібненого матеріалу; своєчасне видалення подрібнених шматків із робочого простору; зведення до мінімуму пилоутворення; безперервне й автоматичне розвантаження; можливість регулювання ступеня дробіння; можливість легкої заміни швидко зношуваних деталей; невелика витрата енергії на подрібнення одиниці продукції; необхідність мати запобіжні частини, які під час деформації або виходу із ладу запобігали б аварії всієї машини [14].

Таблиця 7. Особливості використання обладнання для подрібнення

Тип дробарки	Особливості будови	Переваги використання	Недоліки використання	Література
1	2	3	4	5
Щоква дробарка	Складаються з двох поверхонь (щік), розташованих під невеликим кутом, що зближуються в нижній частині	Вони не займають багато місця та мають просту конструкцію	Застосовуються для крупного і середнього дроблення	[35]
Молоткова дробарка	Сировина подрібнюється від ударів молотків, які обертаються, а також унаслідок ударів матеріалу об ребристу поверхню стінок корпусу	Використовують для дрібного і тонкого подрібнення	Під час подрібнення частина матеріалу може зазнати переподрібнення	[13]
Валкова дробарка	Матеріал живильником подається в дробарку через завантажувальну воронку, захоплюється валками, що обертаються з однаковою швидкістю назустріч один одному, дробляться і розвантажуються вниз під дробарку	Найбільш ефективні для матеріалів помірної твердості, компактні та надійні в роботі, матеріал не переподрібнюється	Малопродуктивні	[13;14]

Проаналізувавши дані (табл. 7), можна зазначити, що на етапі подрібнення доцільно використовувати валкові дробарки, які найбільш ефективні для матеріалів помірної твердості. Завдяки своїй компактності та надійності в роботі вони мають переваги над іншими. Внаслідок однократного стиску матеріал не переподрібнюється.

Наступним необхідним етапом є проведення операцій фасування, пакування та маркування, що забезпечує отримання відповідного товарного вигляду пробіотичного препарату. Важливим на цьому етапі є вибір первинної упаковки, адже вона повинна якісно захищати сухі пробіотичні препарати від впливу різних зовнішніх факторів (температура, вологість навколишнього середовища та кисень), які здатні значно погіршити якість готового препарату впродовж процесу зберігання.

Збереження початкового вмісту вологи в препараті, його температури та зведення до мінімуму впливу кисню підвищують стабільність пробіотичних препаратів. Пробіотичні препарати (саме ліофільно висушені) природно гігроскопічні і, як правило, поглинають будь-яку доступну вологу. Тому для оптимальної упаковки пробіотиків рекомендується використовувати бар'єрні матеріали, які перешкоджають потраплянню вологи та кисню всередину упаковки. Бар'єрні характеристики різних типів упаковки можна порівняти за швидкістю пропускання вологи (MVTR) та швидкістю передачі кисню (OTR). MVTR і OTR — стаціонарна швидкість, при якій водяна пара та кисень проходять через стінку упаковки відповідно до заданих умов температури та відносної вологості [16].

На сьогодні пробіотичні препарати у вигляді ліофілізованого порошку випускають у таких типах первинної упаковки:

- скляні флакони;
- пластикові флакони;
- багатошарові пакетики-саше.

Аналіз публікацій [36—40] показав, що як первинну упаковку доцільно обрати багатошарові пакетики-саше, оскільки вони забезпечують захист від вологи, проходження кисню всередину упаковки та світла на рівні зі склом, але при цьому мають меншу вартість.

Найважливіша функція багатошарових пакетиків-саше полягає в тому, щоб захистити препарат всередині пакета від потрапляння вологи та кисню, що важливо при зберіганні сухих пробіотиків. Як відомо, скло є хімічно інертним, непористим, жорстким пакувальним матеріалом, що забезпечує майже 100% бар'єр для вологи та кисню. Серед матеріалів, що використовуються для виготовлення саше, алюмінієва фольга різної товщини, яка забезпечує захист від вологи та кисню порівняно зі склом. Волого-бар'єрні властивості полімерів також відіграють важливу роль. Серед полімерів, що додатково захищають від вологи, найбільш застосовуваними є поліпропілен (PP) і поліетилентерефталат. Сюди ж відносяться циклоолефінові сополімери, металоцени, нанокompозити тощо [39].

Порівняння стабільності пробіотичного препарату за використання різних типів пакетів-саше за температури 25°C та вологості повітря в межах 60% упродовж шести місяців наведено в табл. 8 [40].

Таблиця 8. Стабільність пробіотичного препарату за використання різних типів пакетів-саше [40]

Тип пакетів-саше*	Кількість життєздатних клітин, КУО/г		
	0 місяців	3 місяці	6 місяців
1	$2,05 \cdot 10^9$	$2,05 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$
2	$2,05 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^7$
3	$2,05 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$

Примітка: * (склад покриття вказаний від зовнішньої до внутрішньої сторони): 1 тип: папір/поліетилен (PE)/алюмінієва фольга/поліетилен (PE); 2 тип: поліетилентерефталат (PET)/алюмінієва фольга/поліетилен (PE); 3 тип: поліетилентерефталат (PET)/алюмінієва фольга/покриття ущільнювачем з сополімером вуглеводневого вінілу (VMCH).

Враховуючи всі дані про кількість життєздатних клітин та вмісту вологи в середині упаковки для всіх трьох типів саше, тип I виявився найбільш дієвим. За використанням саше типу 1 виявлено, що вміст вологи та кількість життєздатних найбільш стабільний протягом усього періоду зберігання [29]. Тож стадія культивування необхідна для отримання біомаси молочнокислих бактерій, зокрема лактобацил, яка складає основу пробіотичного препарату і чинить терапевтичний ефект на організм людини.

На етапі відокремлення біомаси від культуральної рідини пропонується використовувати сепарування. Цей етап здійснюється з метою позбавлення біомаси від залишків поживного середовища та метаболітів, які утворилися під час попередніх етапів біосинтезу.

Стабілізацію біомаси бактерій слід здійснювати додаванням до неї захисного середовища. Ця операція використовується з метою запобігання втрат життєздатних клітин молочнокислих бактерій на наступних стадіях виробництва.

Наступний етап передбачає висушування отриманої біомаси з метою збільшення в подальшому терміну зберігання клітин бактерій та надання їм лікарської форми. Для забезпечення відповідних якісних характеристик за етапом висушування біомаси слідє стадія подрібнення та просіювання до частинок певного розміру.

На завершальних етапах виробництва необхідним є проведення операцій фасування, пакування та маркування, що дасть змогу отримати відповідний товарний вигляд пробіотичного препарату. На сьогодні здійснювати ці операції можна швидко та автоматизовано завдяки високотехнологічному обладнанню. Обладнання, що використовується при виробництві препарату, має бути належним чином спроектоване, мати відповідні розміри, розташовуватися відповідно до свого призначення таким чином, щоб персонал міг здійснювати очищення, санітарну обробку (за необхідності) і технічне обслуговування.

При можливості слід використовувати закриті обладнання або обладнання, що герметично закривається. Якщо використовується відкрите обладнання або таке, що відкривають, необхідно вжити застережних заходів, щоб звести до мінімуму ризик контамінації. Прилади для зважування, апаратура для регулювання і контролю, а також вимірвальне та випробувальне об-

ладнання, яке є критичним для забезпечення якості АФІ, слід калібрувати відповідно до письмових методик і встановленого графіка [10].

Висновки

Отже, у технології виробництва ліофілізованого пробіотичного препарату, що базується на поетапному накопиченні біомаси, доцільно використовувати вітчизняний штам молочнокислих бактерій *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів, важливою перевагою якого є адаптивність до української популяції населення.

Показано, що найбільш ефективно захисне середовище, яке використовується при сушінні біомаси молочнокислих бактерій та забезпечує стабільність клітин у процесі зберігання, — це середовище, що містить сухе знежирене молоко (6%), сахарозу (8%) та желатин (4%). При використанні такого середовища відсоток виживання клітин бактерій становив близько 76% від їх початкової кількості.

При апробації різних типів багат шарових пакетиків-саше виявлено, що вміст вологи та кількість життєздатних бактерій найбільш стабільні протягом усього періоду зберігання за використання пакетика саше, що складався з паперу, поліетилену, алюмінієвої фольги та ще одного шару поліетилену (склад покриття вказаний від зовнішньої до внутрішньої сторони).

Для забезпечення якості АФІ та зведення до мінімуму ризику контамінації на всіх стадіях виробництва пробіотику слід використовувати належне обладнання та проводити контроль навколишнього середовища, які відповідають вимогам СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика», що використовується у виробництві лікарських засобів на основі культур мікроорганізмів [4].

Література

1. Anandharaj M., Rani R. P., Swain M. R. Production of High-Quality Probiotics by Fermentation. *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*. 2017. P. 235—266.
2. Sarao L. K., Arora M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015. Vol. 57, N. 2. P. 344—371.
3. Технологія пробіотиків: Підруч. / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. К.: НУХТ, 2012. 318 с.
4. Янковский Д. С., Моисеенко Р. А., Дьмент Г. С. Особенности отечественных мультипробиотиков. *Современная педиатрия*. 2009. Т. 25, № 3. С. 79—86.
5. Огірчук К. С., Коваленко Н. К., Полтавська О. А. Ідентифікація та біологічні властивості молочнокислих бактерій, ізольованих від жінок старших вікових груп. *Мікробіол. журн.* 2013. Т. 75, № 5. С. 3—9.
6. Гармашева І. Л., Коваленко Н. К., Підгорський В. С., Лівінська О. П., та ін. Взаємодія клітин штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 з глинистими мінералами *in vitro*. *Мікробіол. журн.* 2016. № 4, Т. 78. С. 11—24.
7. Noori F., Tajabadi M., Jafari P. Growth Optimization of *Lactobacillus plantarum* T5jq301796.1, an Iranian Indigenous Probiotic in Lab Scale Fermenter. *Applied F Biotech.* 2016. Vol 3, N. 3. P. 188—193.
8. Cummins J., Ho M.-W. Genetically modified probiotics should be banned. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2005. N. 17. P. 66—68.
9. Farwa Mazhar S., Afzal M., Almatroudi A. et al. The Prospects for the Therapeutic Implications of Genetically Engineered Probiotics. *Journal of Food Quality*. 2020. P. 1—11.

10. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
11. Барышников Н. А., Беляков Г. В., Таирова А. А., Филиппов А. Н. Фильтрация суспензии через пористую среду с учетом гравитации. *Мембраны и мембранные технологии*. 2016. Т. 6, № 1. С. 92—98.
12. Флотация. URL: <https://medic.studio/biotechnologii/flotatsiya-70593.html> (дата звернення 17.02.2020).
13. Черевко О. І., Поперечний А. М. Процеси і апарати харчових виробництв: підручник / О. І. Черевко, А. М. Поперечний. 2-е видання, доп. та випр. Х.: Світ Книг, 2014. 495 с.
14. Doran P. M. Unit Operations. *Bioprocess Engineering Principles*. 2013. P. 445—595.
15. Gueimonde M., Sánchez B. Enhancing probiotic stability in industrial processes. *Microb Ecol Health Dis*. 2012. № 23. P. 1—5.
16. Fenster K., Freeburg B., Hollard C., et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*. 2019. Vol. 7, № 3.
17. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. *J of Nutr and Metabol*. 2013. P. 1—15.
18. Golowczyc M. A, Silva J., Abraham A. G., et al. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Lett Appl Microbiol*. 2010. Vol. 50, N. 1. P. 7—12.
19. Savedboworn W., Kerdwan N., Sakorn A., et al. Role of protective agents on the viability of probiotic *Lactobacillus plantarum* during freeze drying and subsequent storage. *Int F research J*. 2017. Vol. 24, N. 2. P. 787—794.
20. Jalali M., Abedi D., Varshosaz J., et al. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerance* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Res Pharm Sci*. 2012. Vol. 7, N. 1. P. 31—36.
21. Broeckx G., Vandenhuevel D., Claes I. J., et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm*. 2016. Vol. 505, N. 1—2. P. 303—18.
22. Romano A., Blaiotta G., Di Cerbo A., et al. Spray-dried chestnut extract containing *Lactobacillus rhamnosus* cells as novel ingredient for a probiotic chestnut mousse. *J. Appl. Microbiol*. 2014. Vol. 116. P. 1632—1641.
23. Ghandi A., Powell I. B., Howes T., Chen X. D., Adhikari B. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: a laboratory and pilot scale study. *J. Food Eng*. 2012. Vol. 113. P. 194—200.
24. Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G. F., Collins K., Ross R. P. Environmental adaptation of probiotic *lactobacilli* towards improvement of performance during spray drying. *Int. Dairy J*. 2002. Vol. 12. P. 183—190.
25. Paéz R., Lavari L., Vinderola G., Audero G., et al. Effect of heat treatment and spray drying on *lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Res. Int*. 2012. Vol. 48. P. 748—754.
26. Chen H. C., Lin C. W., Chen M. J. The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in kefir. *Asian-Australasian J. Anim. Sci*. 2006. Vol. 19. P. 126—130.
27. Jalali M., Abedi D., Varshosaz J., et al. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus tolerance* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* in oral capsules. *Res. Pharm. Sci*. 2012. Vol. 7. P. 31—36.
28. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol*. 2005. Vol. 99. P. 333—338.
29. Ming L. C., Rahim R. A., Wan H. Y., Ariff A. B. Formulation of protective agents for improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 survival rate subjected to freeze drying for production of live cells in powderized form. *Food Bioprocess Technol*. 2009. Vol. 2. P. 431—436.
30. Foerst P., Kulozik U., Schmitt M., et al. Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food Bioprod. Process*. 2012. Vol. 90. P. 295—300.

31. Hongpattarakere T., Uraipan S. Bifidogenic characteristic and protective effect of saba starch on survival of *Lactobacillus plantarum* CIF17AN2 during vacuum-drying and storage. *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 117. P. 255—261.
32. Santivarangkna C., Kulozik U., Kienberger H., Foerst P. Changes in membrane fatty acids of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying with sorbitol. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009. Vol. 49. P. 516—521.
33. Fowler A., Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1066. P. 119—135.
34. Das S., Bhattacharjee D., Manna A., Basu S. et al. Effect of different excipients and packaging materials on commercial preparation of probiotic formulation. *IJPSR.* 2014. Vol. 5, N. 5. P. 1830—1836.
35. Шокова дробарка. URL: <https://ulbm.in.ua/ua/wiki/shchokova-drobarka> (дата звернення 19.02.2020).
36. Glass as a packaging material in pharmaceutical packaging. URL: <https://www.slideshare.net/shwetashelke35/glass-as-a-packaging-material-in-pharmaceutical-packaging-71496789> (дата звернення 26.01.2020).
37. Fiorentini A. M., Ballus C. A., Oliveira M. L. de, et al. The influence of different combinations of probiotic bacteria and fermentation temperatures on the microbiological and physico-chemical characteristics of fermented lactic beverages containing soybean hydrosoluble extract during refrigerated storage. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos.* 2011. Vol. 31, N. 3. P. 597—607.
38. Probiotics Consumers Demand Very Particular Types of Packaging. URL: <https://www.comar.com/news-room/probiotics-consumers-demand-very-particular-types-of-packaging/> (дата звернення 25.01.2020).
39. Guergoletto K., Sivieri K., Tsuruda A., et al. Food Industrial Processes — Methods and Equipment. Dried Probiotics for use in functional food applications. *Benjamin Valdez (ed.), InTech, Shanghai, China.* 2012. P. 227—235.
40. Das S., Bhattacharjee D., Manna A., Basu S. et al. Effect of different excipients and packaging materials on commercial preparation of probiotic formulation. *Das, et al., IJPSR.* 2014. Vol. 5, N. 5. P. 1830—1836.