МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту (декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ Грегірчак Н.М.	_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» _____ 2020 р.	«___» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Культивування *Lactobacillus plantarum* для отримання пробіотиків

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

Черепанський Вячеслав Валерійович _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Грегірчак Наталія Миколаївна _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Кочубей-Литвиненко О.В. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Черепанському Вячеславу Валерійовичу
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Lactobacillus plantarum* для отримання пробіотиків

керівник роботи Грегірчак Наталія Миколаївна, к.т.н., доцент
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кс
2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Lactobacillus plantarum,* цільовий продукт: сухий пробіотичний препарат, аналітична нормативна документація «Лактобактерин-Біофарма»
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання. РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Технологічна схема виробництва пробіотичного препарату – 2 аркуші формату А1. Апаратурна схема виробництва пробіотичного препарату – 2 аркуші формату А1. Схема автоматизації ділянки ділянки сублімаційного сушіння біомаси *Lactobacillus plantarum* – 1 аркуш формату А2. Схема біосинтезу цільового продукту – 1 аркуш формату А2

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	24.04.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційного роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту.	17.03.20-20.03.20	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.	21.03.20-31.03.20	
3.	Техніко-економічне обґрунтування.	26.03.20-2.04.20	
4.	Біосинтез цільового продукту.	31.03.20-10.04.20	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми.	10.04.20-20.04.20	
6.	Матеріальний баланс і розрахунок обладнання.	10.04.20-20.04.20	
7.	Специфікація обладнання.	18.04.20-28.04.20	
8.	Опис технологічної схеми.	20.04.20-30.04.20	
9.	Контроль виробництва.	30.04.20-10.05.20	
10.	Автоматизація ділянки виробництва.	30.04.20-15.05.20	
11.	Оформлення пояснювальної записки.	16.05.20-31.05.20	
12.	Виконання графічної частини роботи.	20.04.20-25.05.20	

Здобувач _____ Черепанський В.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ……....5
ВСТУП…….6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ ……..……..9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА……...12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування……12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища……19
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента……..….21
2.3.1. Морфолого-культуральні ознаки……21
2.3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки……....23
2.4. Таксономічний статус біологічного агента……..24
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ…….26
3.1. Потреба у цільовому продукті……..……26
3.2. Розрахунок потужності виробництва……..……30
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об’єму ферментера……..…36
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу……...38
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ……42
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента……...42
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт……44
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ…….51
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу……51
5.1.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера…….51
5.1.2. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів……54
5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища……...….64

5.2. Обгрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту…...68
5.2.1. Обґрунтування вибору способу відокремлення біомаси……..…71
5.2.2. Обґрунтування способу попередньої обробки біомаси бактерій……..76
5.2.3. Обгрунтування вибору способу приготування кінцевої форми препарату……...…77
5.2.4. Обґрунтування способу подрібнення…….81
5.2.5. Обґрунтування вибору первинної упаковки……..84
5.3. Обгрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення…….87
5.3.1. Обґрунтування вибору складу захисного середовища…….87
5.3.2. Обгрунтування підготовки вентиляційного повітря…….92
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ..95
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ……...……123
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ……...132
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА……...….156
9.1. Карта постадійного контролю…….156
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту……161
9.3. Концентрація цільового продукту……..162
9.3.1. Концентрація цільового продукту (біомаси)……...162
9.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту……163
9.4. Методи контролю готового препарату «Лактобактерин»……164
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА…….170
10.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації……..170
10.2. Завдання на розробку схеми автоматизації……..173
10.3. Опис функціональної схеми автоматизації……..174
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРА……...177
ДОДАТКИ……...189

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва пробіотичного препарату у вигляді сухого порошку культивуванням молочнокислих бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, який синтезує на середовищі MRS $1 \cdot 10^9$ КУО/мл. Препарати, які відносяться до групи пробіотиків, використовуються для профілактики і лікування захворювань шлунково-кишкового тракту. Розрахована потужність його виробництва становить 308 кг сухої біомаси на рік.

Технологія виробництва субстанції складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів, підготовка вентиляційного повітря, приготування та стерилізація титрувальних розчинів та поживного середовища) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу, сепарування культуральної рідини, додавання захисного середовища до отриманої біомаси, сушіння, подрібнення та просіювання висушеної біомаси, та процес фасування, пакування та маркування цільового продукту), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота викладена на 188 стор. друкованого тексту, містить 30 таблиць, 30 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (120 джерел) та графічної частини (4 креслень формату А1, 2 креслення формату А2).

Ключові слова: пробіотик, *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, лактобактерії, виділення, сепарування біомаси, стабілізація біомаси, сушіння.

ВСТУП

Нині проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології дуже поширена серед населення України. Розвиток цих захворювань в більшості випадків пов'язане з порушенням динамічної рівноваги нормальної мікрофлори кишечника, зокрема зниженням кількості пробіотичних штамів. Це все провокує порушення процесів травлення і хід багатьох біохімічних процесів в організмі, в результаті чого знижується імунітет і стійкість організму до дії патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [1].

Препарати, які надають бактеріотерапевтичну та бактеріопрофілактичну дію на мікробіоту при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, викликаних дисбактерізом, відносяться до групи пробіотиків. Найчастіше в ролі пробіотиків використовують штами лакто- і біфідобактерій [2].

Антагоністична активність і взаємодія з імунною системою детермінують найбільш важливу властивість пробіотичних мікроорганізмів - забезпечення так званої колонізаційної резистентності, під якою розуміють захист кишкової стінки від проникнення у внутрішнє середовище організму бактерій, токсинів і токсичних продуктів різного походження. Захисна функція пробіотиків виражається також в їх антимутагенній активності [3].

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені досить широко. Однак препарати зарубіжного виробництва займають майже весь ринок [4]. Тому виробництво вітчизняних пробіотиків є актуальним завданням, так як їх важливою перевагою є адаптивність штамів мікроорганізмів до української популяції населення [5].

Для виробництва ефективних та якісних пробіотичних препаратів необхідним є ретельний вибір всіх технологічних операцій, які б забезпечили отримання максимальної кількості життєздатних та 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, і важливо проаналізувати та визначити можливі негативні фактори, що можуть вплинути на клітини.

Оскільки клітини пробіотичних мікроорганізмів, зокрема лактобацил, є дуже чутливими до дії зовнішніх факторів (температура, кисень, механічний вплив та ін.) [6], питання правильного вибору технологічних етапів виробництва є досить важливим. Адже від того, яка саме технологічна операція введена в виробничий процес, залежить якість та ефективність даного 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 клітини.

Пробіотики слід виробляти відповідно до правил належної виробничої практики – Good manufacturing practice (GMP). Основною вимогою під час організації виробництва пробіотиків є наявність ізольований приміщень і відповідних технічних засобів. Конструкція обладнання має унеможливлювати зовнішню контамінацію, а також забезпечувати зручність і ефективність його очищення та стерилізації [7].

Актуальність. На сьогоднішній день проблема розробки пробіотиків є надзвичайно актуальною темою в медицині та у ветеринарії. Вченими зі всього світу ведеться активний пошук нових пробіотичних штамів мікроорганізмів, які б мали значний вплив на патогенних мікробів, і як результат, покращували мікрофлору шлунково-кишкового тракту. Виявлено, що найбільш високу ефективність проявляють пробіотики, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів. Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення. Тому, створення пробіотиків на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори є актуальним та важливим завданням [5]. Одним із таких пробіотичних штамів

є *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (УКМ). Цей штам було виділено з шлунково-кишкового тракту людей високогірних селищ Абхазії; показана його висока біологічна активність [8]. Антимікробні речовини, що виробляються ним показали значний вплив на грампозитивні і грамнегативні бактерії.

Новизна. Використання у виробництві пробіотику «Лактобактерин» вітчизняного штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, який адаптований до української популяції населення.

Введення в технологічний процес етапів сепарування та подрібнення, що дасть змогу отримати пробіотичний препарат з відповідними якісним характеристиками (розмір частинок).

Пропонується випускати даний пробіотичний препарат у пакетиках-саше, що дозволить здешевити виробництво, і в той же час захистити препарат від потрапляння вологи та повітря всередину упаковки на рівні із ефективністю скла.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Препарат «Лактобактерин-Біофарма» є мікробною масою живих антагоністично активних клітин *Lactobacillus plantarum*, ліофілізованих у середовищі культивування з додаванням сахарозо-желатино-молочного середовища.

Склад:

- *діюча речовина* – в одній дозі міститься не менше як $1 \cdot 10^9$ КУО лактобактерій;
- *допоміжні речовини* – препарат окрім інгредієнтів середовища культивування містить інгредієнти стабілізувального середовища сушіння, зокрема:
    - сахарозу (ГОСТ 5833-75) або цукор дрібнокристалічний (ТУ 15.8-00372658-005-2004) – від 7 до 10%;
    - желатин (ГОСТ 11293-89) – від 0,7 до 1,0%;
    - молоко знежирене (ДСТУ 2661-94) або згущене нежирне стерилізоване (ДСТУ 4404:2005) – від 15 до 25% [7].

Лікарська форма

Порошок для орального та місцевого застосування по 2, або по 3, або по 5 доз у флаконах № 10 [9].

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

Фармакотерапевтична група

Антидіарейні мікробні препарати. Організми, які продукують молочну кислоту.

- A07 Антидіарейні препарати; засоби, що застосовуються для лікування інфекційно-запальних захворювань кишечнику;
- A07F Антидіарейні мікробні препарати;
- A07F A Антидіарейні мікробні препарати [9].

Фармакологічні властивості

Терапевтичний ефект препарату визначають лактобактерії, що володіють антагоністичною активністю по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, створюють сприятливі умови для розвитку корисної мікрофлори кишечнику. Вказані властивості лактобактерій пов'язані з накопиченням ними (у процесі виробництва) молочної кислоти — сильного антисептика, який зумовлює активність препарату до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (які виявляються та активізуються на тлі тривалої дисфункції кишечнику). Лактобактерії регулюють перистальтику кишечника, підтримують іонний гомеостаз; стимулюють імунну систему та місцевий імунітет; підтримують фізико-хімічні параметри гомеостазу приепітеліальної зони; приймають участь у протипухлинному нагляді та синтезі вітамінів, ферментів, антибіотиків, гормоноподібних субстанцій, незамінних амінокислот, низькомолекулярних жирних кислот, пептидів, сигнальних молекул, у тому числі нейротрансмітерів.

Молочна кислота приймає участь в обміні кальцію в організмі, переводячи кальцій, що міститься в їжі, у лактат кальцію, який краще засвоюється організмом (що сприяє профілактиці рахіту у дітей). Препарат також приймає участь в утворенні вітамінів і розщепленні білків, з утворенням легкозасвоюваних амінокислот, у тому числі незамінних, що синтезуються організмом [9].

Клінічні характеристики

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

Лактобактерин-Біофарма показаний:

- для профілактики розвитку та лікування порушень біоценозу кишечнику різної етіології;
- при акушерсько-гінекологічних процедурах, пов'язаних із санацією статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій та передпологовій підготовці вагітних групи ризику, з порушеннями чистоти вагінального секрету до III-IV ступеня [9].

Умови і терміни зберігання

Препарат потрібно зберігати у сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 ºС. Зберігати у недоступному для дітей місці. Термін придатності – 2 роки [9].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.

Пробіотики – біотехнологічні препарати, що містять живі мікроорганізми, які відносяться до нормальної фізіологічно та еволюційно обґрунтованої флори шлунково-кишкового тракту. На фармацевтичному ринку України є кілька поколінь препаратів для нормалізації мікрофлори кишечника:

- *Перше покоління* – це монокомпонентні препарати, які містять лише один штам бактерій. До них належать «Лактовіт форте», «Колібактерин», «Біфідумбактерин», «Лактобактерин», «Трилакт».
- *Друге покоління* – засоби на основі бактерій, які в нормі не проживають в кишечнику, можуть пригнічувати розвиток патогенних мікроорганізмів. До самоелімінірувальних антагоністів зараховують «Біоспорин», «Ентерол», «Споробактерин», «Сімбітер».
- *Третє покоління* – полікомпонентні препарати, які містять комбінацію декількох штамів бактерій і добавок: «Лінекс», аналоги «Аципол», «Біфіліз», «Ацилакт», «Біфіформ» тощо.
- *Четверте покоління* – сорбовані біфідовмісні пробіотики, це живі бактерії нормофлори, іммобілізовані на сорбенті – «Пробіфор», «Біфідумбактерин Форте», «Флорін Форте» [10].

Для отримання пробіотиків на основі живих культур, як правило, використовують такі мікроорганізми: *B. subtilis, B. adolescent is, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, E. faecalis, E. faecium, E. coli, L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. helveticus, L. reuteri, L. helveticus, L. fermentum, L. lactis, L. rhamnosus, L. plantarum, L. leuconostoc, S. boulardii.*

Пробіотичні препарати, що включать ці мікроорганізми можуть містити як один штам (*монопробіотики*), так і кілька (від двох до 30) штамів мікроорганізмів (*асоційовані пробіотики*) [7].

Сьогодні на ринку України зареєстровано значну кількість моноштамових пробіотиків:

- «Лактобактерин-Біофарма» (ПрАТ «Біофарма», Україна);
- «Мутафлор» («Ardeypharm», Німеччина);
- «Лінекс Бебі» («Lek Pharmaceuticals d.d.», Словенія);
- «Ентерожерміна» («Laboratoire UNITHER», Італія) та ін [7].

Препарат «Лактобактерин-Біофарма» належить до моноштамових пробіотиків, для виробництва якого використовують один із штамів лактобактерій: *L.plantarum* або *L.fermentum*. Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання даного пробіотику за використання різних продуцентів наведено у табл. 2.1.

Проаналізувавши дані можна сказати, що найвищий показник синтезу біомаси – $1.25 \cdot 10^{10}$ КУО/мл досягається при культивуванні *L. plantarum* T5jq301796.1. Найнижча концентрація клітин спостерігається у *L. fermentum* UCO-979C ($1 \cdot 10^{8}$ КУО/мл). Така кількість біомаси досягається при культивуванні *L. fermentum* UCO-979C та *L. plantarum* T5jq301796.1 впродовж 24 год.

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу (див. *табл. 2.1*) є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ для культивування всіх чотирьох продуцентів (табл. 2.2). Дані наведені у табл. 2.2, засвідчують, що середовище для культивування *L. fermentum* UCO-979C та *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627є найдорожчим за вартістю (52.54 грн за 1 л) у порівнянні з середовищами для культивування *L.plantarum* T5jq301796.1 (39.85 грн за 1 л), та *L.plantarum* K10 (50.63 грн за 1 л). Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту (*табл. 2.3*).

Таблиця 2.1

Особливості одержання пробіотику за допомогою *L.plantarum* К10, *L.fermentum* UCO-979C, *L.plantarum* T5jq301796.1 *та L. plantarum* 337Д УКМ В-2627

Біологічний агент	**Склад поживного середовища, г/л**	**Тривалість культиву-вання, год**	**Концент-рація клітин, КУО/мл**	**Особливості процесу біосинтезу**	**Використана література**
L. plantarum К10	- дріжджовий екстракт – 4.0; - м'ясний екстракт – 10.0; - гідролізат казеїну – 10.0; - глюкоза – 20.0; - цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0; - ацетат натрію – 5.0; - твін 80 – 1.0; - K_2HPO_4 – 2.0; - $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.2; - $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0,05.	18	$1 \cdot 10^9$	pH = 7, t = 37°C, анаеробні умови	[11]
L. fermentum UCO-979C	- дріжджовий екстракт –5,0; - м'ясний екстракт –10,0; - гідролізат казеїну – 10,0; - глюкоза –20,0; - твін 80 –1,0; - ацетат натрію – 5,0; - цитрат амонію – 2,0; - K_2HPO_4 – 2,0; - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; - $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0,05.	24	$1 \cdot 10^8$	pH=7, t = 37°C, в мікро-аерофільних умовах (10% CO_2)	[12]

L. plantarum T5jq301796.1	- Глюкоза – 25.96; - Дріжджовий екстракт – 18.4; - Na_3PO_4 – 0.2; - K_2HPO_4 – 0.2; - $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.01; - твін 80 – 1.0; - Вітамінний розчин – 1.0 мл.	24	$1.25 \cdot 10^{10}$	pH=7.26, t = 37°C, анаеробні умови	[13]
L. plantarum 337Д УКМ В-2627	- дріжджовий екстракт –5,0; - м'ясний екстракт –10,0; - гідролізат казеїну – 10,0; - глюкоза –20,0; - твін 80 –1,0; - ацетат натрію – 5,0; - цитрат амонію – 2,0; - K_2HPO_4 – 2,0; - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; - $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0,05.	24	$1 \cdot 10^9$	pH=7, t = 37°C, n=40 об/хв анаеробні умови	[8]

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *L.plantarum* К10, *L.fermentum* UCO-979C, *L.plantarum* T5jq301796.1, та *L.plantarum* 337Д УКМ В-2627

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компо-нента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1, 2 ,3 ,4 ,5)*
L.plantarum К10	дріжджовий екстракт – 4.0	1632	6,25	1
	м'ясний екстракт – 10.0	2563	25,63	2
	гідролізат казеїну – 10.0	1728	17,28	1
	глюкоза – 20.0	23	0,46	4
	цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0	75	0,15	3
	ацетат натрію – 5.0	50	0,25	2
	твін 80 – 1.0	210	0,21	4
	K_2HPO_4 – 2.0	192	0,38	4
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.2	65	0,01	4
	$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0,05	55	0,01	4
Вартість 1 л середовища – 50,63 грн.				
L. fermentum UCO-979C	дріжджовий екстракт – 5,0	1632	8,16	1
	м'ясний екстракт – 10.0	2563	25,63	2
	гідролізат казеїну – 10.0	1728	17,28	1
	глюкоза – 20.0	23	0,46	4
	цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0	75	0,15	3
	ацетат натрію – 5.0	50	0,25	2
	твін 80 – 1.0	210	0,21	4
	K_2HPO_4 – 2.0	192	0,38	4
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.2	65	0,01	4
	$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0.05	55	0,01	4
Вартість 1 л середовища – 52,54 грн.				
L. plantarum T5jq301796.1	Глюкоза – 25.96	23	0,6	4
	Дріжджовий екстракт – 18.4	1632	30,0	1
	Натрію фосфат – 0.2	50	0,01	2
	K_2HPO_4 – 0.2	120	0,024	4
	$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0.01	55	0,01	4
	твін 80 – 1.0	210	0,21	4
	Вітамінний розчин – 1.0 мл	8,20		4
Вартість 1л середовища – 39,05 грн.				

Продовження таблиці 2.2

L. plantarum 337Д УКМ В-2627	дріжджовий екстракт – 5,0	1632	8,16	1
	м'ясний екстракт – 10.0	2563	25,63	2
	гідролізат казеїну – 10.0	1728	17,28	1
	глюкоза – 20.0	23	0,46	4
	цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0	75	0,15	3
	ацетат натрію – 5.0	50	0,25	2
	твін 80 – 1.0	210	0,21	4
	K_2HPO_4 – 2.0	192	0,38	4
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.2	65	0,01	4
	$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$ – 0.05	55	0,01	4
Вартість 1 л середовища – 52,54 грн.				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на травень 2020 р.:

1. http://www.agar.com.ua, 2. http://art-medika.com,

3. https://mendeleevmarket.com.ua, 4. http://www.prom.ua.

Для коректного розрахунку вартості 1 г цільового продукту потрібно перейти від КУО/мл до г/л. Це можна зробити шляхом розрахунку теоретично можливої біомаси виходячи з кількості азоту в середовищі культивування. Для розрахунку обрано *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 та його середовище культивування. Джерелом азоту в середовищі виступає дріжджовий екстракт. В дріжджовому екстракті азот міститься у вигляді NH_3 (17%). З 5 г дріжджового екстракту ми маємо 0,85 г аміаку. Тоді 17 г аміаку містить 14 г азоту, а в 0,85 цієї сполуки вміст азоту дорівнює: 0,85·14/17=0,7 г. Якщо у біомасі міститься 10 % азоту, то з 0,7 г азоту можна одержати 7 г/л біомаси. Але це значення є достатньо великим через те, що дріжджовий екстракт використовується також як джерело факторів росту. Тому ми приймаємо значення біомаси з методичних вказівок, і воно дорівнює 3 г/л.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні *L.plantarum* K10, *L.fermentum* UCO-979C, *L.plantarum* T5jq301796.1, та *L.plantarum* 337Д УКМ В-2627

Біологіч-ний агент	Вартість 1 л середови-ща, грн	Концентра-ція клітин, КУО/мл	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культиву-вання, год	Кількість утворених клітин за годину, КУО/мл за год
L. plantarum K10	50.63	$1 \cdot 10^9$	16.87	18	$5.5 \cdot 10^7$
L. fermentum UCO-979C	52.54	$1 \cdot 10^8$	21.02	24	$4.1 \cdot 10^6$
L. plantarum T5jq301796.1	39.05	$1.25 \cdot 10^{10}$	7.81	24	$5{,}2 \cdot 10^8$
L. plantarum 337Д УКМ В-2627	52.54	$1 \cdot 10^9$	17.51	24	$4.1 \cdot 10^7$

Попри високу продуктивність штаму *L. plantarum* T5jq301796, його використання є доволі небезпечним, адже даний штам є генно-модифікованим [13]. У зв'яку з цим існує ризик переносу генів між лактобактеріями та біфідобактеріями, що населяють травний тракт, що дозволяє припустити, що генетичні штами молочнокислих бактерій можуть змінити всю мікробну екологію травного тракту непередбачуваним чином [14]. Також ризик використання ГМ-пробіотиків пов'язаний з стійкістю та поширенням цих інженерних пробіотиків у зовнішньому середовищі, що спричинить непердбачувані зміни в ньому [15].

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання вітчизняного пробіотику молочнокислі бактерії *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627, адже важливою перевагою є адаптивність даного штаму до української популяції населення у порівнянні з представленими для порівняння штамами. Незважаючи на триваліший процес культивування у порівнянні з молочнокислими бактеріями

L. plantarum K10, концентрація клітин, синтезована *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627, є достатньо високою ($1 \cdot 10^9$ КУО/мл), а умовна вартість 1 г цільового продукту є середньою у порівнянні з іншими (17.51 грн/г).

Продуктивність біосинтезу клітин у *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 є більшою на один порядок порівняно з *L. fermentum* UCO-979C ($4.1 \cdot 10^7$, та $4.1 \cdot 10^6$ КУО/мл за год відповідно), оскільки за 24 год *L. fermentum* UCO-979C накопичує $1 \cdot 10^8$ КУО/мл, тоді як *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 за 24 год – $1 \cdot 10^9$ КУО/мл.

Зважаючи на відносно не дорогу вартість 1 г цільового продукту та достатньо високу продуктивність, а також те, що штам *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 є найбільш придатним для розробки вітчизняного пробіотичного препарату, він є найкращим продуцентом пробіотиків з проаналізованих штамів.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Розраховуємо поживне середовище для вирощування молочнокислих бактерій штаму *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627, який накопичує 3 г/л біомаси за 24 год культивування.

Далі наведений розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецю. Як джерело вуглецю для одержання біомаси лактобактерій використовується глюкоза, гідролізат казеїну та дріжджовий екстракт.

Потреби для синтезу біомаси:

- *Розрахунок вмісту глюкози*:
  - У біомасі міститься 50% вуглецю, отже вміст вуглецю у 3 г біомаси становить 3×0,5 = 1,5 г. Ця кількість вуглецю міститься у (1,5 × 100)/40 = 3,75 г/л глюкози. Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 3 г/л біомаси у середовище необхідно внести 5,25 г/л глюкози.
- *Розрахунок вмісту гідролізату казеїну*:

- В казеїні міститься 55% вуглецю. Для накопичення 3 г біомаси необхідно: (1,5× 100) / 55 = 2,72 г/л. Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 3 г/л біомаси у середовище необхідно внести 3,8 г/л гідролізату казеїну.

- *Розрахунок вмісту дріжджового екстракту*:
  - У дріжджах міститься 47% вуглецю, тому кількість дріжджового екстракту, що необхідна становить: (1,5×100)/47 = 3,19 г/л Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 3 г/л біомаси у середовище необхідно внести 4,5 г/л дріжджового екстракту.

Далі наведений розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення. Як джерело азоту для одержання біомаси лактобактерій використовується дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну та цитрат амонію.

Потреби для синтезу біомаси:

- *Розрахунок вмісту дріжджового екстракту:*
  - У біомасі міститься 10 % азоту. Таким чином, у 3 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить (3 × 0,10) = 0,3 г. У дріжджовому екстракті міститься 10% азоту, тому необхідно внести: 0,3×100/ 10=3 г/л.

- *Розрахунок вмісту гідролізату казеїну*:
  - В гідролізаті казеїну міститься 17% азоту. Для накопичення 3 г біомаси необхідно внести: 0,3×100 / 17 = 1,8 г/л.

- *Розрахунок вмісту цитрату амонію:*
  - Цитрат амонію є джерелом органічного азоту, та містить його в кількості 17%. Для накопичення 3 г біомаси необхідно внести: 0,3×100 / 17 = 1,8 г/л.

Джерелами інших елементів, що необхідні для клітинного росту є дріжджовий екстракт (джерело фактору росту); м'ясний екстракт; KH_2PO_4; ацетат натрію; $MgSO4{\times}7H_2O$.

Відомо [8] наступний склад поживного середовища для культивування *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 (г/л):

- дріжджовий екстракт –5,0;
- м’ясний екстракт –10,0;
- гідролізат казеїну – 10,0;
- глюкоза –20,0;
- твін 80 –1,0;
- ацетат натрію – 5,0;
- цитрат амонію – 2,0;
- K_2HPO_4 – 2,0;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2;
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 0,05.

Дане поживне середовище повністю задовольняє ріст культури *L. plantarum*, що підтверджується наведеними розрахунками.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.

2.3.1. Морфолого-культуральні ознаки. Молочнокислі бактерії *Lactobacillus planratum* являють собою грампозитивні (*рис.2.1*) палички із закругленими кінцями, прямі, мають розміри 0,9-1,2 х 1-2 мкм, що розташовуються поодиноко, парами або короткими ланцюжками (*рис.2.2, рис.2.3*). Нерухливі. Неспороутворюючі [16,17].

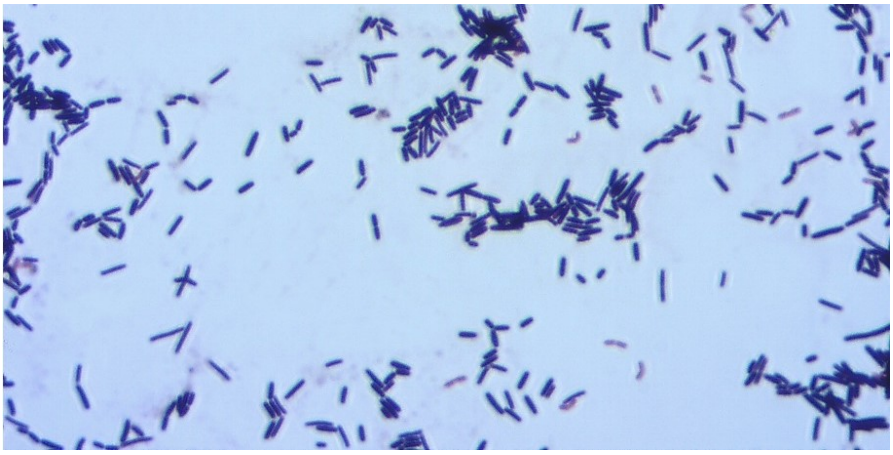


Рис.2.1. Бактерії *L. plantarum*, фарбування за Грамом [16].

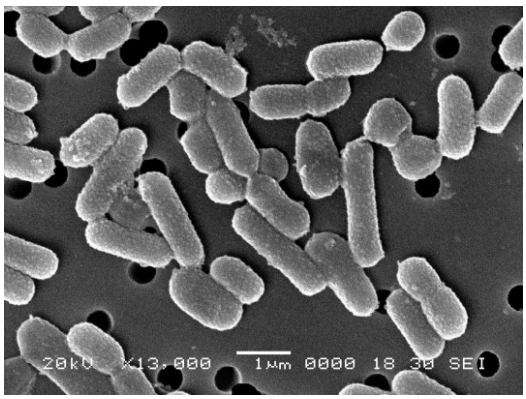


Рис.2.2. Бактерії *L. plantarum* (електронна мікроскопія) [17].

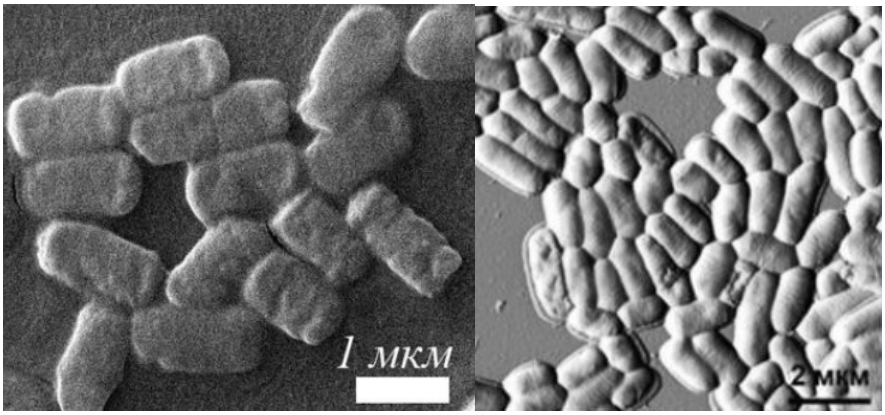


Рис. 2.3. Електронна мікроскопія клітин *L. plantarum* (зліва – скануюча елкетронна, справа – атомно-силова) [19].

На щільних поживних середовищах лактобацили формують колонії сферичні, гладкі, непрозорі, іноді блискучі, опуклі, з рівними чіткими контурами (*рис.2.4*) . Діаметр колоній в середньому 3 мм. Колонії як правило, не пігментовані, білі або злегка кремового кольору, іноді – жовтуваті. На середовищах з білками або ліпідами зони просвітління навколо колоній зазвичай не утворюються [20].

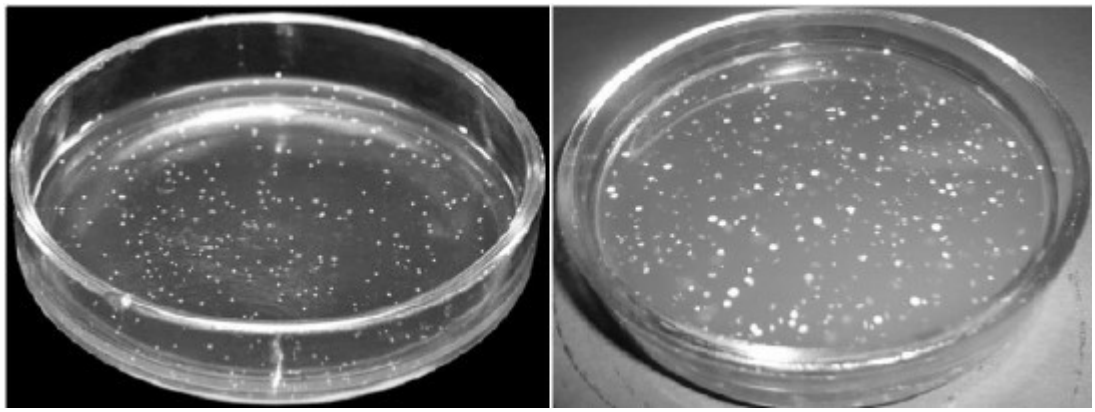


Рис. 2.4. Колонії *L. plantarum* на агаризованому середовищі MRS [19].

При глибинному посіві на тверде живильне середовище утворюються щільні колонії у вигляді правильних лінз, трикутної і неправильної форми або нагадують сніжинку. Якщо в середовище була додана крейда, то навколо колоній внаслідок накопичення молочної кислоти утворюються зони розчинення крейди (*рис. 2.5*) [19].

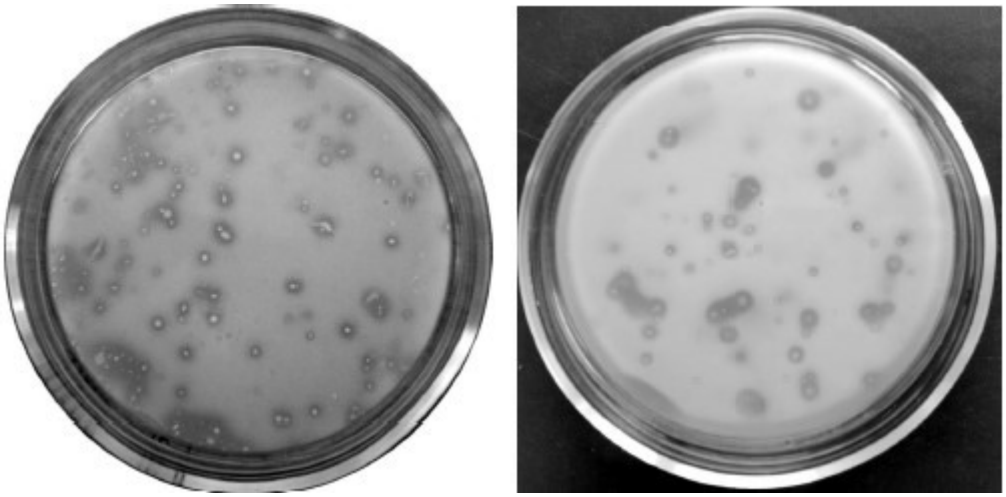


Рис. 2.5. Колонії лактобацил на капустяному агарі [19].

При рості на рідких поживних середовищах бактерії *L. plantarum* найчастіше викликають рівномірне помутніння, майже відразу після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчастого осаду, ніколи не утворюючи плівок на поверхні середовища. Для культивування бактерій використовували селективні поживні середовища: МРС та капустяне [16].

2.3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки. Бактерії *L.plantarum* є факультативними анаеробами. По відношенню до температури відносяться до мезофілів. Температурний оптимум розвитку лежить в межах 30-40°С [7, 10].

Фізіологічною особливістю лактобактерій є їх кислотостійкість. Для росту лактобацил найбільш сприятливі злегка підкислені середовища з початковим pH 5.4-6.4. Бактерії *L. plantarum* зберігають здатність до росту навіть при pH 2.8 [19].

L. plantarum входить до групи факультативно гетероферментативних лактобактерій; гексози майже повністю перетворюються на молочну кислоту

шляхом Емдена-Майєргофа-Парнаса, тоді як пентози перетворюються на молочну та оцтову кислоти через 6-фосфоглюконат за рахунок індукції фосфокетолази. І L-, і D-молочна кислоти утворюються НАД-залежними лактатдегідрогеназами (LDH).

Лактобацили - хемоорганогетеротрофи. Дуже вимогливі до джерел живлення, потребують багатих складних середовищ. З вуглеводів вони переважно зброджують гексози (глюкозу, фруктозу, манозу, галактозу) і дисахариди (лактозу, мальтозу, сахарозу), і тільки гетероферментативні види, а саме *L. plantarum*, також зброджують пентози (рибозу, ксилозу, арабинозу). Лактоза - дисахарид, тому перш ніж вступити на шлях катаболізму, вона повинна бути розщеплена ферментом галактозидазу до глюкози і галактози. Галактоза потім фосфорилюється з утворенням глюкозо-6-фосфату. Цукор зазвичай транспортується в клітину пермеазами і фосфорилюється в цитоплазмі [17].

Крім вуглеводів, лактобактерії потребують для свого розвитку різні фактори росту: амінокислоти, вітаміни, нуклеотиди. Рибофлавін, пантотенова і нікотинова кислоти є найбільш необхідними для життєдіяльності більшості видів, тіамін необхідний переважно гетероферментативним лактобацилам [19].

Іноді лактобацили називають «метаболічними інвалідами», оскільки вони втратили здатність до синтезу ряду метаболітів, ймовірно, в результаті своєї спеціалізації (ріст в молоці та інших середовищах, багатих поживними і ростовими речовинами). Так, вони не здатні утворювати порфірини, зокрема, гем, тому вони позбавлені таких гемопротеїнів, як цитохроми і каталаза.

Відновлення нітрату для лактобацил не характерно, крім умов, коли кінцевий pH підтримується 6.0 і / або гем міститься в середовищі. Желатину не розріджують. Казеїн не розщеплюють, але утворюють невеликі кількості розчинного азоту. Індол і сірководень не утворюють.

Вміст гуаніну і цитозину в ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) становить 32-55 % [19].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Положення *L. plantarum* згідно Другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [21]:

- Домен: *Bacteria*;
- Відділ: *Firmicutes*;
- Клас: *Bacilli*;
- Порядок: *Lactobacillales*;
- Родина: *Lactobacillaceae*;
- Рід: *Lactobacillus*;
- Вид: *Lactobacillus plantarum*.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Пробіотичні препарати на основі штамів лактобацил найбільш широко застосовують в клінічній практиці. Зазначені препарати показані при:

- хронічних колітах різної етіології, зокрема неспецифічних виразкових колітах, соматичних захворюваннях, ускладнених дисбактеріозами;
- в акушерсько-гінекологічній практиці для санації статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій та передпологовій підготовці вагітних групи "ризику" 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 статевої сфери (бактеріальних вагінозів, у тому числі у вагітних, бактеріальних кольпітів, викликаних стафілококом та кишковою паличкою, сенільних кольпітів гормональної природи) [22].

У комплексній терапії вище згаданих захворювань провідну роль відіграють пробіотичні препарати, ефективність яких залежить від біологічних властивостей бактерій виробничих штамів, що входять до їх складу. Наявність у пробіотиків високої антагоністичної активності щодо умовно-патогенних бактерій і помірно виражений рівень адгезивної активності є необхідними чинниками, що забезпечують порівняно швидке якісне і кількісне відновлення популяції аутофлори пацієнта, зокрема індикаторних видів лакто- і біфідобактерій [10].

Поширеність хвороб органів травлення (ХОТ) на сучасному етапі надзвичайно широка [23], а їх повсюдно зростаюча частота захворюваності оцінюється як епідемія. І у світі, і в Україні показники захворюваності на

ХОТ прогресивно зростають, подвоюючись щодесятиліття. У структурі поширеності захворювань в Україні ці патології знаходяться на третьому місці, у структурі смертності – на четвертому [24].

Одне з провідних місць у структурі захворювань шлунково-кишкового тракту за тяжкістю перебігу, частотою ускладнень і летальності займають хронічні запальні захворювання кишечника, до яких у наш час відносять неспецифічний виразковий коліт, хворобу Крона, синдром подразненого кишечника та ін. [23]. Всі вони протікають із періодами загострень та ремісій [25].

Актуальність проблеми визначається також значним поширенням хвороб органів травлення серед дітей та підлітків і не завжди задовільними результатами лікування. За останні два десятиліття одним із наслідків несприятливих змін у різних сферах життєдіяльності суспільства стало погіршення здоров'я дітей, у тому числі зростання хронічних форм соматичної патології. В Україні до 60 % дитячого населення страждає від різних соматичних хвороб, причому захворюваність продовжує зростати [23].

Не менш поширеними є запальні захворювання статевих органів у жінок. За статистичними даними вони займають перше місце серед всіх гінекологічних захворювань і являються однією з причин порушення дітородної функції жіночого організму [26]. Далі на рис. 3.1 зображено, яка кількість хворих за вище згаданими захворюваннями серед відповідних груп населення України.

Рис. 3.1. Поширеність захворювань кишечника та запальних захворювань статевих органів серед жінок [23,26,27,28].

Одним із пробіотичних препаратів, які використовуються у комплексному лікуванні даних хвороб є моноштамовий пробіотичний препарат «Лактобактерин - Біофарма». Тому його було обрано для розрахунку річної потреби у пробіотику.

У зв'язку з тим, що виробник «Лактобактерин – Біофарма» не вказав вагу сухої біомаси в одній дозі препарату, було проаналізовано препарати, які відносяться до групи A07F A01 Лактобактерії [29]. Для аналізу взято препарат «Лацидофіл», у одній дозі якого міститься не менше $1x10^9$ КУО ліофілізованих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* R0011 масою приблизно 24 мг [30]. Також взято препарат «Лінекс форте», », у одній дозі якого міститься не менше $1x10^9$ КУО *Lactobacillus acidophilus* масою приблизно 25,74 мг [31]. Виходячи з цієї інформації, для розрахунку прийнято середнє значення маси сухої біомаси в одній дозі, яке дорівнює приблизно 25 мг.

Препарат використовується при лікуванні та профілактиці захворювань кишечника та лікуванні неспецифічних запальних захворюваннях жіночих статевих органів [9]. Тривалість прийому та дози:

- при лікуванні захворювань кишечника (дорослі) – тривалість прийому 28-42 дні, 10-15 доз препарату на добу;
- при лікуванні захворювань кишечника у дітей (0-17 років) – тривалість прийому 28-42 дні, 6-10 доз препарату на добу;
- при лікуванні неспецифічних запальних захворюваннях жіночих статевих органів – тривалість використання 10-12 днів, 3-6 доз препарату на добу;
- при профілактиці захворювань кишечника (дорослі) – тривалість прийому 21-28 днів, 10-15 доз препарату на добу;
- при профілактиці захворювань кишечника у дітей (0-17 років) – тривалість 21-28 днів, 10-15 доз препарату на добу [9].

Для розрахунку річної потреби у пробіотику необхідно розрахувати

кількість пробіотичної біомаси (в г) на 1 людину, яка буде лікуватись цим препаратом.

Тоді:

- при лікуванні захворювань кишечника (дорослі):

$$15 \text{ доз} \cdot 42 \text{ дні} \cdot 25 \text{ мг} = 15750 \text{ мг або } 15{,}75 \text{ г сухої біомаси на 1 людину;}$$

- при лікуванні захворювань кишечника у дітей (0-17 років):

$$10 \text{ доз} \cdot 42 \text{ дні} \cdot 25 \text{ мг} = 10500 \text{ мг або } 10{,}5 \text{ г сухої біомасина 1 дитину;}$$

- при лікуванні неспецифічних запальних захворюваннях жіночих статевих органів:

$$6 \text{ доз} \cdot 12 \text{ дні} \cdot 25 \text{ мг} = 1800 \text{ мг або } 1{,}8 \text{ г сухої біомаси на 1 жінку;}$$

- при профілактиці захворювань кишечника (дорослі):

$$15 \text{ доз} \cdot 28 \text{ днів} \cdot 25 \text{ мг} = 10500 \text{ мг або } 10{,}5 \text{ г сухої біомаси на 1 людину;}$$

- при профілактиці захворювань кишечника у дітей (0-17 років):

$$10 \text{ доз} \cdot 28 \text{ днів} \cdot 25 \text{ мг} = 7000 \text{ мг або } 7 \text{ г сухої біомаси на 1 дитину;}$$

Далі у таблиці 1.1 наведені вихідні дані та узагальнений розрахунок річної протреби.

Таблиця 3.1

Вихідні дані та розрахунок річної потреби у пробіотику

Захворювання (профілактика)	**Доза препарату на добу [9,32]**	**Тривалість прийому, днів [9,32]**	**Кількість пробіотичної біомаси (в г) на 1 людину**	**Кількість хворих в Україні на 2015 рік**	**Загальна кількість біомаси на рік, кг**
Лікування захворювань кишечника (дорослі)	10-15 доз	28-42	15,75	269367 [23]	4242,53
Лікування захворювань кишечника у дітей (0-17 років)	6-10 доз	28-42	10,5	7206 [27,28]	75,663
Лікування неспецифічних запальних захворюваннях жіночих статевих органів	3-6 доз	10-12	1,8	275754 [26]	496,357

Профілактика захворювань кишечника (дорослі)	10-15 доз	21-28	10,5	269367 [23]	2828,353
Профілактика захворювань кишечника у дітей (0-17 років)	6-10 доз	21-28	7	7206 [27,28]	50,442
					Всього **7693,345 кг**

3.2 Розрахунок потужності виробництва

На українському ринку лікарських препаратів переважають імпортні пробіотики. Так, станом на 1 жовтня 2016 року ринок пробіотиків мав наступний вигляд (рис. 3.2) [22] :

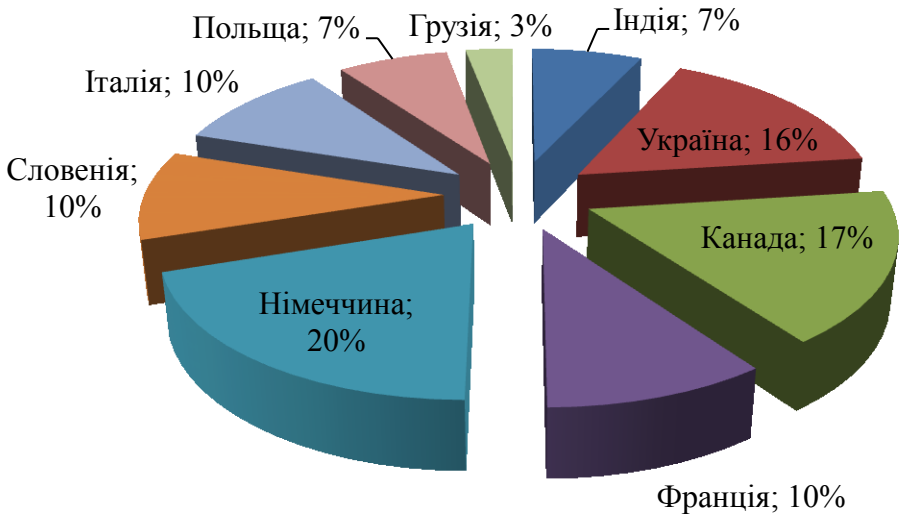


Рис. 3.2. Виробники пробіотичних лікарських препаратів, представлених на фармацевтичному ринку України станом на 1 жовтня 2016 року[22].

Як видно з рис. 3.2, закордонні фірми займають біля 80 % українського фармацевтичного ринку в цій області. Станом на 1 січня 2016 року, до Державного реєстру лікарських засобів України включено 30 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: ЗАТ «Партнер» (Росія), ТОВ «Бакорен» (Росія), «Віта-фарма» (Росія), «Мікроген» (Росія), НВРУП «Діалек» (Білорусія), «Pharmachion» (Болгарія), «Ferrosan» (Данія), Institut Rosell Inc. (Канада), «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «Genom Biotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Франція), Mili Healthcare (Великобританія), «Merckle» (Німеччина) [22].

Українська фармацевтична лінія пробіотичних препаратів представлена виробниками: ДП «Ензим» (Україна) – 1 препарат, ПрАТ «Біофарма» (Україна) – 4 препарати. Лікарські препарати даної фармакотерапевтичної групи представлені на ринку України у вигляді таких лікарських форм: порошки, краплі, таблетки й капсули.

Наразі, станом на 1 травня 2020 року, закордонні фірми займають весь український фармацевтичний ринок в цій області, і до Державного реєстру лікарських засобів України включено 18 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «Genom Biotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Італія), «Merckle» (Німеччина) [4].

Проведений аналіз асортименту лікарських засобів досліджуваної групи показав, що переважно це препарати, які містять біфідо-, колі- та лактобактерії, а також дріжджі (рис. 3.3).

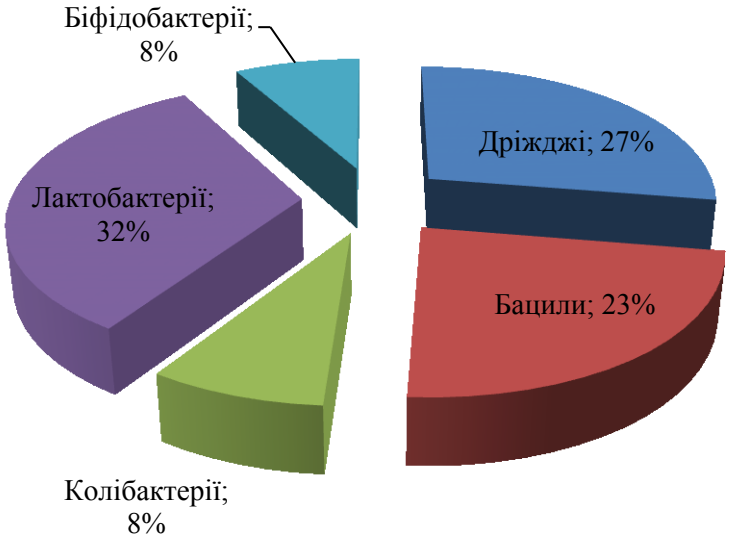


Рис 3.3. Складові пробіотичних препаратів на фармацевтичному ринку України [22].

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко і різняться за своїм складом та призначенням. За складом вони поділяються на монопробіотики та комплексні пробіотики. Монокомпонентні препарати – це монокультури живих мікроорганізмів, які містять представників нормальної мікрофлори кишечнику. Перевагою монопробіотиків у порівнянні з іншими групами пробіотиків є те, що вони

затримуються організмі людини на триваліший період часу, що значно підвищує лікувальний ефект. Це пов'язано з тим, що використовувані мікроорганізми виявляються в усіх біотопах травного тракту.

Найбільш поширеними групами пробіотичних мікроорганізмів, які використовуються для виробництва монопробіотиків є представники родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. У порівнянні з біфідобактеріями, лактобактерії мають ряд переваг. Лактобактерії мають високу адгезію до слизових оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару, завдяки чому вони особливо важливі при патології шлунково-кишкового тракту та урогенетального тракту. Встановлено, що деякі види лактобактерій знижують ризик утворення каменів у нирках, завдяки оксалатмодифікуючій активності.

Сьогодні на ринку України зареєстровано значну кількість моноштамових пробіотиків. Перелік даних пробіотиків наведено у табл. 3.2. Проаналізувавши ці дані, можна виділити основні переваги моноштамового препарату «Лактобактерин-Біофарма» на ринку монокомпонентних пробіотиків України:

- по-перше, даний препарат вироблений на основі лактобацил, які займають провідне місце у складі мікробної екологічної системи людини, підтримуючи баланс і стабілізуючи гомеостаз за рахунок надійного закріплення на слизовій оболонці кишечника, визначаючи основні ніші співіснування для інших мікроорганізмів. Завдяки своїм адгезивним властивостям, пробіотичні штами бактерій не дають можливості колонізувати слизові оболонки патогенним та умовно-патогенним мікроорганізмам. Тому пробіотичні штами отримують селективну перевагу у порівнянні з менш пристосованими бактеріями.
- по-друге, даний препарат показаний для застосовують з лікувальною та профілактичною метою дорослим і дітям (з перших місяців життя), що значно розширює кількість потенційних покупців препарату.

Оскільки основою пробіотиків є живі клітини мікроорганізмів, адаптовані до певних умов існування та досить сильно реагують на їх зміну. Симбіотична мікрофлора людей, які проживають в регіонах з різними кліматичними умовами, раціонами харчування не є абсолютно однаковими. Тому слід приймати до уваги тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом.

Тобто, найбільш високу ефективність проявляють пробіотики, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів. Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення. Тому, створення пробіотиків на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори є актуальним та важливим завданням [5].

Оскільки, за даними ринку пробіотиків України за 2016 р., вітчизняні пробіотики займали 16 % ринку (5 препаратів), то всередньому кожен пробіотичний препарат займав 3,5%. При виході на ринок з новим перпаратом можна прийняти, що хоча б нішу одного препарату буде зайнято. Тому при розрахунку річної потреби пробіотику з урахуванням ринку України було прийнято охоплення ринку в 4%.

Розрахунок потреби пробіотика з урахуванням тенденцій ринку України наведено у таблиці 3.3.

Таблиця 3.2

Перелік моноштамових пробіотиків на ринку України [14]

Назва пробіотика	Культура	Вміст мікроорганізмів у дозі, КУО	Виробник	Показання для застосування
Лактобактерин-Біофарма	*Lactobacillus plantarum* або *Lactobacillus fermentum*	не менше $1 \cdot 10^9$	ПрАТ «Біофарма», Україна	Препарат застосовують з лікувальною та профілактичною метою дорослим і дітям (з перших місяців життя). Показаний: - для профілактики розвитку та лікування захворювань кишечнику різної етіології; - при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій у жінок [9].
Мутафлор	*Escherichia coli* NISSLE 1917	не менше 10^8	«Ardeypharm», Німеччина	- Профілактика патологічних колонізацій у кишечнику в новонароджених (у т.ч. недоношених); - підвищення імунітету новонароджених (у т.ч. недоношених); - діарея у дітей грудного та дошкільного віку, в тому числі при годуванні через зонд [33].
Лінекс Бебі	*Bifidobacterium animalis subsp . lactis*	не менше $1 \cdot 10^9$	«Lek Pharmaceuticals d.d.», Словенія	Немовлятам з першого дня народження та дітям віком до 12 років: - для стабілізації та підтримки балансу та функції мікрофлори кишечнику; - як профілактичний та підтримуючий засіб у разі діареї, метеоризму та інших порушень, викликаних: - вірусними та бактеріальними інфекціями шлунково-кишкового тракту (наприклад ротавірусними інфекціями), - лікуванням із застосуванням протимікробних препаратів [34].
Ентерожерміна	*Bacillus clausii*	не менше $2 \cdot 10^9$	«Laboratoire UNITHER», Італія	- Лікування та профілактика дисбактеріозу кишечнику та пов'язаного з ним ендогенного дисвітамінозу. - Терапія, спрямована на відновлення нормальної мікрофлори кишечнику, що порушується під час лікування антибіотиками або хіміотерапевтичними препаратами [35].

Продовження таблиці 3.2

Лактовіт Форте	*Bacillus coagulans*	Не менше $1{,}2 \cdot 10^8$	«Mepro Pharmaceuticals Private Limited», Індія	Лактовіт Форте призначають для лікування дорослих і дітей віком від 6 місяців, які страждають на хронічні коліти різної етіології, у тому числі неспецифічні виразкові коліти; у разі соматичних захворювань, ускладнених дисбактеріозами, що виникли в результаті застосування антибіотиків, сульфаніламідних препаратів та з інших причин; також застосовують в акушерсько-гінекологічній практиці при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій та передпологовій підготовці вагітних групи ризику із порушенням чистоти вагінального секрету до III—IV ступеня [36].
Ентерол 250	*Saccharomyces boulardii* CNCM I -745	-	« Biodex», Франція	- Профілактика та лікування колітів і діареї, пов'язаних з прийомом антибіотиків. - Дисбіоз кишечника. - Гостра та хронічна бактеріальна діарея. - Гостра вірусна діарея. - Синдром подразненого кишечника. - Діарея мандрівника. - Псевдомембранозний коліт і захворювання, зумовлені *Clostridium difficile*. - Діарея, пов'язана з довгостроковим ентеральним харчуванням [37].

Таблиця 3.3

Розрахунок річної потреби у пробіотику з урахуванням тенденцій ринку України

Захворювання (профілактика)	**Кількість пробіотичнлї біомаси (в г) на 1 людину**	**Кількість хворих в Україні на 2015 рік**	**Кількість хворих, яка лікуватиметься вітчизняними пробіотиками (16 %)**	**Загальна кількість пробіотичної біомаси на рік при охопленні ринку на 4%, кг**
Лікування захворювань кишечника (дорослі)	15,75	269367 [23]	43099	169,7
Лікування захворювань кишечника у дітей (0-17 років)	10,5	7206 [27,28]	1152	3
Лікування неспецифічних запальних захворюваннях жіночих статевих органів	1,8	275754 [26]	44121	19,86
Профілактика захворювань кишечника (дорослі)	10,5	269367 [23]	43099	113,14
Профілактика захворювань кишечника у дітей (0-17 років)	7	7206 [27,28]	1152	2
				Всього **307,7 кг**

Як видно з розрахункової таблиці на рік потрібно виробити 307,7 кг пробіотичної біомаси.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об’єму ферментера.

Для забезпечення пробіотичним препаратом хворого населення України, необхідно отримувати 308 кг біомаси сухого пробіотику в рік.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

З даних статті [8] відомо, що в культуральній рідині після концентрування міститься 1 $\times 10^9$ КУО/мл. У зв’язку з відсутністю даних з концентрації біомаси в культуральній рідині, доцільно розрахувати теоретично можливу кількість біомаси виходячи з кількості азоту в середовищі культивування. Джерелом азоту в середовищі виступає

дріжджовий екстракт. В дріжджовому екстракті азот міститься у вигляді NH_3 (17%). З 5 г дріжджового екстракту ми маємо 0,85 г аміаку. Тоді 17 г аміаку містить 14 г азоту, а в 0,85 г цієї сполуки вміст азоту дорівнює: 0,85·14/17=0,7 г. Якщо у біомасі міститься 10 % азоту, то з 0,7 г азоту можна одержати 7 г/л біомаси. Але це значення є великим через те, що дріжджовий екстракт використовується також як джерело факторів росту. Тому ми приймаємо значення біомаси з методичних вказівок, і воно дорівнює приблизно 3 г/л.

Така біомаса досягається за $Т_Ф$ = 24 год культивування [8]. Вміст сухих речовин в готовому продукті $СР_{ГП}$ складає частку 0,95.

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$Т_{ЦФ} = Т_Ф + Т_{ПО} = 24 + 10 = 34 \text{ год},$$

де $Т_Ф$ – час культивування (24 год); $Т_{ПО}$ – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

$К_1$ – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) приймемо $К_1$ = 1,1. Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $Е_{СВ}$= 0,1.

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 270 ($Т_{РД}$).

При кількості трудоднів рівному 270, кількість продукту на добу ($G_{НТД}$) становитиме:

$$G_{\text{нтд}} = \frac{G_{\text{нт}}}{T_{\text{рд}}} = \frac{308}{270} = 1{,}14 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту за цикл:

$$G_{\text{ц}} = \frac{G_1 \cdot \text{Т}_{\text{цф}}}{24} = \frac{1{,}14 \cdot 34}{24} = 1{,}6 \ {}^{\text{кг}}/_{\text{цикл}}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл)

$$V_{\text{кр}} = \frac{\text{К}_1 \cdot G_{\text{ц}} \cdot \text{СР}_{\text{гп}}}{\text{Р}_{\text{кр}} \cdot (1 - \text{Е}_{\text{св}})} = \frac{1{,}1 \cdot 1{,}6 \cdot 0{,}95}{3 \cdot (1 - 0{,}1)} = 0{,}63 \text{ м}^3$$

Кількість циклів за рік:

$$K_{\text{ц}} = \frac{G_{\text{нт}}}{G_{\text{ц}}} = \frac{308}{1{,}6} = 192{,}5 \text{ циклів}$$

Приймаємо 193 цикли.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 1%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{630}{1 - 0{,}1} = 700 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{\text{зф}}$ = 0,7 його приблизний геометричний об'єм складе:

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_{\text{зф}}} = \frac{700}{0{,}7} = 1000 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{НФ}$ = 1000 л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{V_{\text{нф}}} = \frac{700}{1000} = 0{,}7$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом$V_Ф$= 700 л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{НФ}$ = 1000 л.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс}} = \frac{V_{\text{ф}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{700}{1 + 0{,}1} = 640 \text{ л}$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} – V_{\text{пс}} = 700 – 640 = 60 \text{ л}.$$

Для одержання 63 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{60}{1 - 0{,}1} = 67 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{67}{1 + 0{,}1} = 61 \text{ л}$$

де $X_{па}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 67 - 61 = 6 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{па}$= 64 л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об’ємом

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{67}{0{,}7} = 96 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об’ємом стандартний ферментер $V_{нпа}$ = 100 л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$\text{К}_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{67}{100} = 0{,}67$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{пм2}$ = 6 л можна одержати під час культивування у малому інокуляторі геометричним об’ємом 10 л та коефіцієнтом заповнення $К_{ЗК}$ = 0,7.

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$К_{зпа} = \frac{V_{па}}{V_{гпа}} = \frac{6}{10} = 0{,}6$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пспа} = \frac{V_{па}}{1 + X_{па}} = \frac{6}{1 + 0{,}1} = 5{,}4 \text{ л}$$

де $X_{па}$ – доза інокуляту для посівного апарату (0,1).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пмпа} = V_{па} - V_{пспа} = 6 - 5{,}4 = 0{,}6 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву посівного апарату $V_{пм3}$ = 0,6 л можна одержати культивуванням у колбах. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{кол} = \frac{V_{пмі}}{1 - E_{кол}} = \frac{0{,}6}{1 - 0{,}01} = 0{,}6 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у колбах становитиме:

$$V_{пск} = \frac{V_{кол}}{1 + X_{кол}} = \frac{0{,}6}{1 + 0{,}1} = 0{,}54 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$$V_{пмк} = V_{кол} - V_{пск} = 0{,}6 - 0{,}54 = 0{,}06 \text{ л} = 60 \text{ мл}$$

Приблизний загальний необхідний об’єм качалочних колб при заданому $К_{колб}$ = 0,7:

$$V_{гколб} = \frac{V_{колб}}{K_{зколб}} = \frac{0{,}6}{0{,}7} = 0{,}86 \text{ л}$$

Об’єм 1 качалочної колби $V_{нколб}$ = 0,5 л.

Кількість качалочних колб при заданому коефіцієнті заповнення $К_{колб}$ = 0,7:

$$N_{колб} = \frac{V_{гколб}}{V_{нколб}} = \frac{0{,}86}{0{,}5} = 1{,}7 \text{ шт.}$$

Приймаємо 2 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси пробіотику у ферментері об'ємом 1000 л з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у три етапи (рис. 3.4)

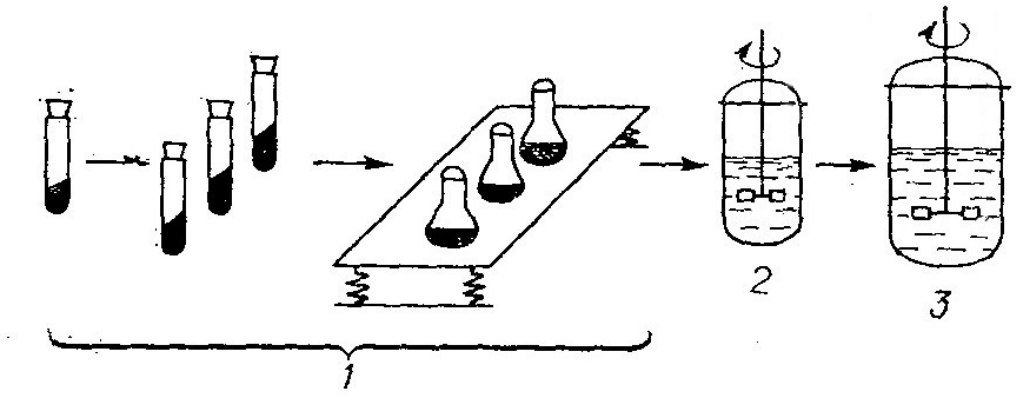


Рис. 3.4. Схема приготування посівного матеріалу:

1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агаризованому середовищі в пробірках і на рідкому поживному середовищі в колбах);

2 – вирощування в посівному апараті об'ємом 10 л.

3 – вирощування в посівному апараті об'ємом 100 л.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу біомаси молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 є глюкоза, яка є складовою середовища MRS, на якому здійснюється процес культивування [8]. Згідно KEGG, катаболізм глюкози відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз) [38], про що свідчить наявність ключового *ферменту 6-фосфофруктокінази 1 (КФ.2.7.1.11)*. Наведена схему перетворення даного вуглеводу (*рис. 4.1*).

Гліколізу у *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 притаманні певні особливості, пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху. Так, перетворення α-D-глюкозо-1-фосфат на α-D-глюкозо-6-фосфат відбувається під дією ферменту *фосфоглюкомутази (КФ.5.4.2.2)*.

Фермент *глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9)* каталізує взаємне перетворення α-D-глюкозо-6-фосфату, β-D-фруктозо-6-фосфату і β-D-глюкозо-6-фосфату. Потім *6-фосфофруктокіназа 1 (КФ.2.7.1.11)* активує перетворення β-D-фруктозо-6-фосфату на β-D-фруктозо-1,6-дифосфат

На наступному етапі, під дією ферменту *фруктозобіфосфатальдолази, клас II (КФ.4.1.2.13)* здійснюється перетворення β-D-фруктозо-1,6-дифосфату на гліцеральдегід-3-фосфат.

Далі фермент *гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12)* залучається до перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат, який під дією *фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3)* перетворюється на 3- фосфогліцерат.

Фермент *фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11)* каталізує перетворення 3-фосфогліцерату до 2-фосфогліцерату, який за допомогою *енолази*

(КФ.4.2.1.11) перетворюється на фосфоенолпіруват.

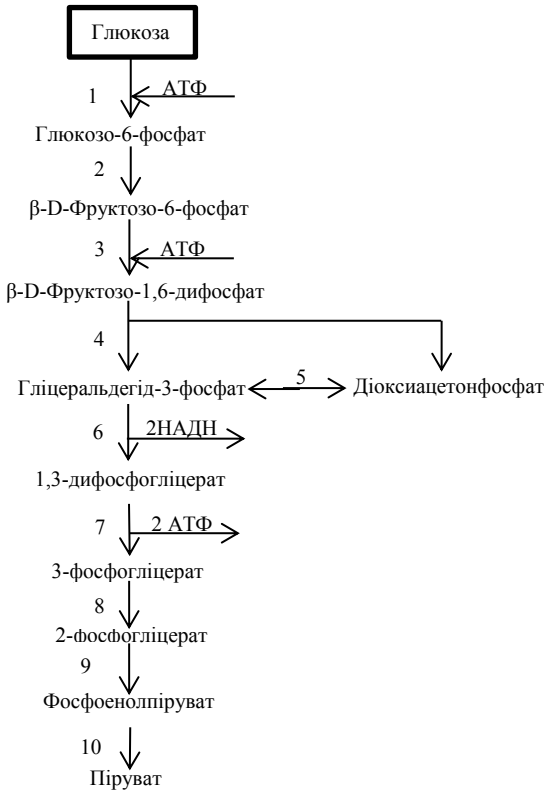


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози у *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627.

ферменти: 1 – *глюкокіназа (КФ.2.7.1.2)*; 2 – *глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.)*; *3 – 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ.2.7.1.11)*; *4 – фруктозобіфосфатальдолаза, клас II (КФ.4.1.2.13)*; *5 – триозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1)*; *6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12)*; *7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3)*; *8 – фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.11)*; *9 – енолаза (КФ.4.2.1.11)*; 10 – *піруваткіназа (КФ.2.7.1.40)* [38].

Заключним етапом гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват за допомогою *піруваткінази (КФ.2.7.1.40)*. Далі піруват залучається до метаболізму за участю специфічної *піруватдегідрогенази Е1 (КФ.1.2.4.1)* та *піруватдегідрогенази Е2 (КФ.2.3.1.12)*.

Усі реакції гліколізу, за винятком трьох (гексокіназної, фосфорукто-кіназної та піруваткіназної), повністю оборотні.

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Цільовим продуктом синтезу є біомаса молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627. Понад 95% клітинного матеріалу складається з макромолекул. На частку білків припадає приблизно 52%, нуклеїнових кислот – 19% маси сухої речовини. Близько 3% становлять низькомолекулярні органічні сполуки та солі.

Таблиця 4.1

Вміст макромолекул у бактеріальній клітинах

Макромолекули	**Кількість, г/100 г сухих клітин**
Білки	52,4
Полісахариди	16,6
Ліпіди	9,4
РНК	15,7
ДНК	3,2

Основні метаболіти-попередники для процесів конструктивного метаболізму утворюються як інтермедіати центральних метаболічних шляхів. До останніх належать **цикл трикарбонових кислот, гліколіз (глюконеогенез)** і **пентозофосфатний цикл.** Мікроорганізми, у яких функціонують як центральні шляхи інші механізми, тим не менше мають і ці основні шляхи, але неповні (наприклад розімкнений цикл трикарбонових кислот через відсутність 2-оксоглутаратдегідрогенази), або задоволення потреб цих клітин у метаболітах-попередниках забезпечують самі альтернативні механізми (наприклад шлях Ентнера—Дудорова).

Десять із двадцяти амінокислот, що входять до складу білків, утворюються з проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот. Інтермедіати циклу трикарбонових кислот використовуються також для синтезу тетрапіролів та інших клітинних компонентів. Отже, пул інтермедіатів ЦТК (циклу трикарбонових кислот) повинен постійно поповнюватися, що й відбувається в анаплеротичних реакціях.

Пентозофосфатний цикл є постачальником НАДФН (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений) для реакцій конструктивного метаболізму і рибози — для синтезу нуклеотидів.

У реакціях гліколізу та інших шляхах катаболізму глюкози утворюються фосфорильовані вуглеводи, необхідні для синтезу полісахаридів [38,39].

Біосинтез амінокислот. Вуглецеві скелети амінокислот будуються з проміжних продуктів обміну, аміногрупи вводяться *прямим амінуванням* або *трансамінуванням*.

Всі необхідні для синтезу білків амінокислоти утворюються з певних метаболічних попередників (*табл. 4.2*).

Таблиця 4.2

Попередники біосинтезу амінокислот

Попередники	**Родина амінокислот**	**Синтезовані амінокислоти**
Піруват	Піруватна	Аланін, валін, лейцин
Оксалоацетат	Аспартатна	Аспартат, аспарагін, метіонін, лізин, треонін, ізолейцин
2-Оксоглутарат	Глутаматна	Глутамат, глутамін, аргінін, пролін
3-Фосфогліцерат	Піруватна	Серин, гліцин, цистеїн
Фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат	Ароматичних амінокислот і гістидину	Фенілаланін, тирозин, триптофан
5-Фосфорибозил-1-пірофосфат+АТФ	Ароматичних амінокислот і гістидину	Гістидин

Молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, як і інші бактерії, синтезують лізин через діамінопімелінову кислоту. Синтез даної амінокислоти розпочинається з утворення L-4-Аспартилфосфату за взаємодії пірувату та аспартату за участі ферменту *аспартаткінази (КФ.2.7.2.4)*. Потім за участі ферменту *аспартатнапівальдегіддегідрогенази (КФ.1.2.1.11)* з L-4-Аспартилфосфату утворюється L-Аспартат-4-напівальдегід. Після ряду проміжних перетворень даної сполуки за участі

ферменту *діамінопімелатдекарбоксилази (КФ.4.1.1.20)* з мезо-2,6-діамінопімелату утворюється лізин.

Аланін та аспартат синтезується з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Аспарагін утворюється з аспартату за участі ферменту *аспартатлігази (КФ.6.3.1.1)*.

Утворений з L-4-Аспартилфосфату, за участі ферменту *аспартатнапівальдегіддегідрогенази (КФ.1.2.1.11)*, напівальдегід аспарагінової кислоти є попередником синтезу треоніну та метіоніну. У результат двох послідовних перетворень напівальдегіду аспарагінової кислоти утворюється фосфо-L-гомосерин. Утворена сполука за участі ферменту *треонінсинтази (КФ.4.2.3.1)* перетворюється в амінокислоту треонін. Метіонін утворюється у результаті дії на L-гомоцистеїн ферменту *метіонінсинатази (КФ.2.1.1.13)*.

Дезамінування треоніну приводить до утворення 2-оксобутирату, який в результаті послідовної дії чотирьох ферментів перетворюється за участі ферменту *амінотрансферази (КФ.2.6.1.42)* на ізолейцин. Під дією ферменту *амінотрансферази (КФ.2.6.1.42)* 2-оксоізовалеріат, який попередньо утворився з пірувату, перетворюється на амінокислоту валін. Амінокислота лейцин за участі того ж ферменту утворюється з 4-метил-2-оксопентаноату. Серин, гліцин і цистеїн синтезується з 3-фосфогліцерину, а пролін та аргінін – із глутамату.

Складнішим є синтез ароматичних амінокислот. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват конденсуються за участі ферменту *3-дезокси-7-фосфогептулонатсинтази (КФ.2.5.1.54)* з утворенням 7-фосфо-2-дегідро-3-дезокси-D-арабіногептонату, яка піддається циклізації за участі ферменту *3-дегідрохінатсинтази (КФ.4.2.3.4)*. Загальним проміжним продуктом синтезу ароматичних амінокислот є хоризмат, який утворюється з 5-О-(1-Карбоксивініл)-3-фосфатшикімату за участі ферменту *хоризматсинтази (КФ.4.2.3.5)*. У цій точці біосинтетичний шлях розгалужується на два: 1)

утворення триптофану через антранілат за участі ферменту *триптофансинтази (КФ.4.2.1.20)*; 2) утворення тирозину та фенілаланіну через префенат за участі ферментів *гістидинолфосфатамінотрансферази (КФ.2.6.1.9)*.

Синтез гістидину розпочинається 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, який у результаті дев'яти реакцій перетворюється на гістидинал, який в свою чергу під дією ферменту *гістидинолдегідрогенази (КФ.1.1.1.23)* перетворюється на гістидин [38,39].

Біосинтез нуклеотидів. Попередниками піримідинових нуклеотидів є карбомоїлфосфат та аспартат. Аспартат утворюється з оксалоацетату шляхом трансамінування з глутаматом. Карбамоїлфосфат утворюється з NH_3, CO_2 і двох молекул АТФ (аденозинтрифосфат) за участі ферменту *карбамоїлфосфатсинтази (КФ.6.3.5.5)*.

Конденсація карбамоїлфосфату і аспартату за участі ферменту *аспартаткарбамоїлтрансферази (КФ.2.1.3.2)* дає карбамоїласпартат, який піддається циклізації за участі ферменту *дигідрооротази (КФ.3.5.2.3)* і перетворюється на 4,5-дигідрооротат. Дегідрування цієї сполуки за участі ферменту *дигідрооротатдегідрогенази (КФ.1.3.1.14)* приводить до утворення оротату. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом за участі ферменту *оротатфосфорибозилтрансферази (КФ.2.4.2.10)* дає оротидинмонофосфат, який далі декарбоксилюється за участі ферменту *оротидин-5-фосфатдекарбоксилази (КФ.4.1.1.23)* в уритидинмонофосфат.

Синтез пуринових нуклеотидів проходить складнішим шляхом. У результаті метаболічного шляху, який починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфат, за участі ферменту *фосфорибозилформілгліцинамідлігази (КФ.6.3.3.1)* утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, надходять із бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає іноземмонофосфат, який утворюється з 5-фосфорибозил-5-формамідо-4-імідазолкарбоксаміду за участі ферменту *ІМФ-*

циклосинтази (КФ.3.5.4.10). Декілька додаткових реакцій приводять від ІМФ (інозинмонофосфат) до АМФ (аденінмонофосфат) або до ГМФ (гуанозинмонофосфат) і нарешті утворюються АТФ і ГТФ (гуанозинтрифосфат) за участі ферменту *нуклеозиддифосфаткінази (КФ.2.7.4.6)* [38,39].

Біосинтез ліпідів. До складу ліпідів бактеріальної клітини входять такі три основні компоненти:

1) 3-фосфогліцерин;

2) два вуглеводневі компонети, синтезовані з Ацетил-КоА (у бактерій це C_{14}-C_{18}-жирні кислоти, активовані утворенням тіоефірного зв'язку з ацил-переносним білком (АПБ), які потім утворюють ефіри з гліцерином);

3) полярна група, представлена різними сполуками. Так, у фосфоліпідів з гліцерином зв'язаний фосфат.

3-Фосфогліцерин утворюється у реакції відновлення діоксиацетонфосфату за участю біосинтетичної *гліцерол-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.1.1.94)*.

Попередником жирних кислот є ацетил-КоА. Проте ланцюг у даному разі подовжується не за рахунок конденсації двох молекул ацетил-КоА з наступною подальшою конденсацією утвореної C_4-сполуки з ацетил-КоА. КоА-похідні не є субстратами ферментів, що беруть участь у синтезі жирних кислот. Замість них використовується ацил-переносний білок (АПБ), який містить як простетичну групу 4'-фосфопантетеїн, тобто схожий на кофермент А. Ацетил-АПБ функціонує у синтезі жирних кислот як затравка, а C_2-фрагменти приєднуються до цієї затравки у формі малоніл-КоА. Малоніл-КоА утворюється з ацетил-КоА за участю одного з ключових ферментів біосинтезу жирних кислот — *ацетил -КоА-карбоксилази (КФ.6.4.1.2)*.

Для подовження ацил-АПБ на два атоми вуглецю необхідно чотири ферменти. Спочатку ацетил-АПБ реагує з малоніл-АПБ з утворенням ацетоацетил-АПБ за участі ферменту *3-кетоацил-АПБ-синтази (КФ.2.3.1.179)*, який потім відновлюється до β-гідроксибутирил-АПБ за

участі ферменту *3-кетоацил-АПБ-редуктази (КФ.1.1.1.100)*. Відщеплення води дає кротоніл-АПБ за участі ферменту *β-гідроксиацил-АПБ-дегідрогенази (КФ.4.2.1.59)*, а наступне відновлення за участі ферменту *еноїл-АПБ-редуктази (КФ.1.3.1.9)* приводить до утворення бутирил-АПБ. Потім після кількох повторностей даних реакцій утворюються C_{16}-C_{18}-жирні кислоти.

Попередниками синтезу фосфоліпідів є фосфатидна кислота (діацил-3-фосфогліцерин), яка утворюється з ацил-АПБ і 3-фосфогліцерину двома етапами.

На першому етапі фермент *гліцерол-3-фосфаттрансфераза (КФ.2.3.1.275)* приєднує ацильну частину від ацил-АПБ до спиртової групи 3-фосфогліцерину з утворенням ацил-3-фосфогліцерину. На другому етапі інший аналогічний фермент, *1-ацилгліцерол-3-фосфатацилтрансфераза (КФ.2.3.1.51)*, ацилює С2-гідроксильну групу ацил-3-фосфогліцерину з утворенням діацил-3-фосфогліцерину (фосфатидної кислоти). Утворенню фосфоліпідів передує активація фосфатидної кислоти за участю ЦТФ (цитидинтрифосфат) з утворенням ЦДФ-діацилгліцерину за участю фермента *фосфатидатцитидилтрансферази (КФ.2.7.7.41)*. Фосфатидилгліцерин утворюється з ЦДФ-діацилгліцерину і фосфогліцерину двома етапами за участю двох ферментів — *гліцерофосфатфосфатидилтрансферази (КФ.2.7.8.5)* (утворюється складний ефір і вивільнюється ЦМФ (цитидинмонофосфат)) і *фосфатидилгліцерофосфатази (КФ.3.1.3.27)* (вивільнюється Фн (неорганічний фосфат)).

Дифосфатидилгліцерин (кардіоліпін) утворюється конденсацією двох молекул фосфатидилгліцерину з відщепленням гліцерину за участі ферменту *карболіпінсинтази A/B (КФ.2.7.8.-)* [38,39].

Біосинтез вуглеводів, які є компонентами клітинної стінки. УДФ-галактоза утворюється з глюкозо-6-фосфату у результаті декількох послідовних перетворень. Утворення УДФ-галактози проходить за участі ферменту *УДФ-глюкозо-4-епімерази (КФ.5.1.3.2)*.

Гексозаміни, що утворюються з фруктозо-6-фосфату. Фруктозо-6-фосфат перетворюється на глюкозамін-6-фосфат за рахунок глутаміну як донора аміногрупи та за участі ферменту *глутамінфруктозо-6-фосфаттрансфераза (КФ.2.6.1.16)*. Із глюкозамін-6-фосфату утворюються інші гексозаміни.

УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін - попередники пептидоглікану - також синтезуються з глюкозамін-6-фосфату. Спочатку фосфатна група переноситься з положення 6 у положення 1 з утворенням глюкозамін-1-фосфату за участі ферменту *фосфоглюкозамінмутази (КФ.5.4.2.10)*. Наступна реакція з ацетил-КоА дає N-ацетилглюкозамін-1-фосфат за участі ферменту *глюкозамін-1-фосфат-N-ацетилтрансферази (КФ.2.3.1.157)*, який зв'язується з УДФ (уридиндифосфатом). На останньому етапі УДФ-N-ацетилглюкозамін реагує з фосфоенолпфруватом за участі ферменту *УДФ-N-ацетилмураматдегідрогенази (КФ.1.3.1.98)*, утворюючи УДФ-N-ацетилмурамову кислоту [38,39].

Детальну схему перетворення ростового субстрату глюкози на кінцевий продукт – біомасу наведено в графічній частині проекту.

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обгрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 передбачається здійснювати глибинним способом в ферментерах. По-перше, тому, що *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 є анаеробом, і такий спосіб культивування забезпечує анаеробні умови. По-друге, при глибинному культивуванні в багато разів у порівнянні з вирощуванням продуцента на поверхні середовища збільшується накопичення біомаси (із розрахунку на одиницю об'єму поживного середовища), тобто збільшується кількість клітин продуцента в кожному мілілітрі культуральної рідини. *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 – анаеробний штам, тож для його культивування аерація не потрібна.

Вирощування культури здійснюється періодичним способом, для забезпечення максимального виходу біомаси.

Оптимальна температура для культивування *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 - 37°С, а оптимальне значення pH нейтральне, тож можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Необхідно провести стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища. Для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск [8].

Отже, культивування даного продуцент проходить за періодичного глибинного культивування в стерильних та анаеробних умовах.

Для культивування *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 ми обираємо ферментер в якому не відбувається аерація, оскільки продуцент є анаеробом і не потребує кисню.

В даній роботі передбачено використання ферментеру з механічним

перемішуванням для інтенсифікації масообміну. Оскільки процес культивування *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 не супроводжується утворенням міцелію, утворенням речовин, які призводили б до значного збільшення в'язкості середовища, та передбачає забезпечення не дуже інтенсивного перемішування середовища доцільним є використання лопатевої мішалки (з шістьма лопатями). Також ферментер оснащений чотирма відбивними перегородками для запобігання утворенню воронки при перемішуванні.

Ферментер повинен бути забезпечений обладнанням для достатнього перемішування культури, підтримки необхідної температури, а також контрольно-вимірювальним приладами.

Підтримання температури, оптимальної для росту клітин бактерій і прояву ними підвищеної фізіолого-біохімічної активності, забезпечується сорочкою ферментера або системою змійовиків, які забезпечують подачу води для охолодження або пари в процесі стерилізації.

Спостереження за основними процесами життєдіяльності організму здійснюється контрольно-вимірювальною апаратурою, що дозволяє підтримувати на заданому рівні температуру всередині ферментера, pH середовища, тиск в середині ферментера та інші параметри. Ферментер забезпечений пристосуваннями для перенесення інокуляту, внесення додаткових поживних речовин, необхідних для покращення розвитку продуцента та пристроєм для взяття проб.

Для забезпечення стерильності процесу ферментації в ферментері повинні бути використані торцеві ущільнення валу перемішуючого пристрою з паровим захистом. За допомогою застосування такої конструкції вдається практично повністю запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, що є дуже важливим для збереження асептичних умов культивування [40].

Ферментер BIORUS об'ємом 1000 л задовольняє всі вище зазначені вимоги (рис. 5.1). Далі наведена його коротка характеристика.

Ферментер:

- 1000 л загальний об'єм;
- 700 л робочий об'єм;
- стерилізується на місці, з подвійною стінкою з нержавіючої сталі 304L з поздовжнім оглядовим вікном з підсвічуванням;
- 3 порти DN25; порти: для подачі підживлення, для датчика температури, запасний порт, порт для пробовідбору, дренажний клапан.

Рис. 5.1. Ферментер BIORUS 1000 л [41]

Привід:

- нижній магнітний привід/верхній механічний з подвійним торцевим ущільненням. Діапазон швидкістю вала від 40 до 300 об/хв.

Перемішування:

- Вал з трьома мішалками;
- Подвійне механічне ущільнення з паровим затвором;
- 4 відбійника, 10% від внутрішнього діаметра ферментера.

Температурний контур для стерилізації та культивування:

- Стерилізація на місці, через подвійну стінку з'єднану з нагрівальним контуром. Подачі пари з редукційним клапаном для

стерилізації периферичних компонентів. Температурний контур для стерилізації та культивування з'єднаний з подвійною стінкою.

- Теплообмінник для опалення, теплообмінник для охолодження води, циркуляційний насос, трубопроводи та всі необхідні клапани;

Вимірювання і контроль:

- контроль швидкості. Двигун постійного струму контролюється перетворювачем частоти, в тому числі точного виявлення швидкості обертання валу мішалки з індуктивним датчиком. Діапазон швидкостей від 40 до 400 об / хвилину;

- контроль температури. Вимірювання і контроль температури датчиком Pt100 вставленим в бічній порт судини. Контролер активує електричний нагрів або клапан париабо клапан охолоджуючої води в нагрівальний контур

- pH контроль. Вимірювання і контроль pH в інтервалі між pH 2-12, +/- 0,05. pH-датчик з гелевим електродом вставлений в бічній порт судини. Контролер активує подачу кислоти або лугу насосом або клапаном [41].

5.1.2. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробничі приміщення повинні мати між собою технологічний зв’язок і розташовуватися за ходом технологічного процесу для уникнення перехрещення потоків сировини та готових виробів, чистого та використаного посуду, а також повинні бути створені відповідні умови для дотримання виробничої та особистої гігієни працюючим персоналом [42].

Основною вимогою під час організації виробництва пробіотиків є наявність ізольованих приміщень і відповідних технічних засобів. Через небезпеку перехресної контамінації потрібно передбачати додаткові заходи,

зокрема організацію виробництва за принципом окремих циклів роботи та використання закритих систем.

Оптимальною схемою виробничих приміщень є схема «приміщення в приміщенні» (рис. 5.2). При цьому вхід і вихід персоналу, передача матеріалів, продуктів і відходів слід здійснювати виключно через повітряні шлюзи [43].

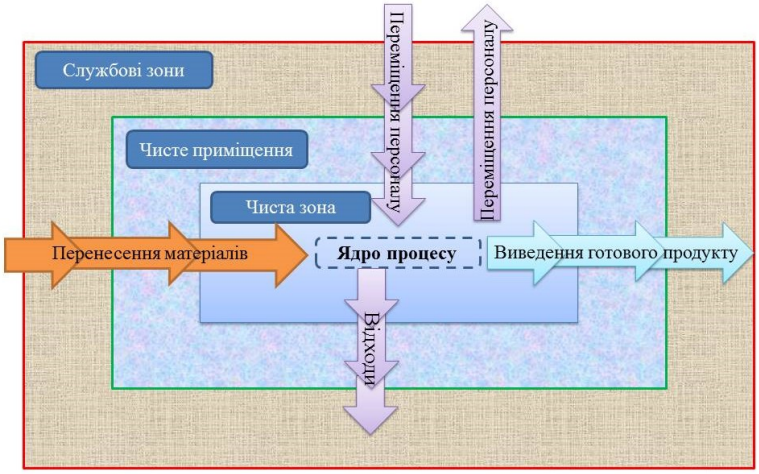


Рис. 5.2. Схема «приміщення в приміщенні».

Підготовку виробничих приміщень слід проводити в одязі, передбаченому для виробничих приміщень того ж класу чистоти для уникнення додаткового забруднення і, при необхідності, в респіраторі. Дезінфекційна обробка виробничих приміщень, в яких не проводиться контроль мікробіологічної чистоти, не обов'язкова.

Для дотримання чистоти у виробничих приміщеннях необхідним є встановлення металевих або педальних бачків з кришками, а також корзини із полімерних матеріалів для збору санітарного браку та сміття. Бачки та корзини повинні щоденно очищатися, промиватися та дезінфікуватися дезінфікуючими засобами. Забороняється зберігати у виробничих приміщеннях миючі, дезінфікуючі засоби, відходи, інвентар, які не мають безпосереднього відношення до виробничого процесу Зберігання протирального інвентарю, миючих та дезінфікуючих засобів здійснюється в окремих приміщеннях. Інвентар (відра, щітки тощо) повинен бути

маркірований і закріплений за виробничими, допоміжними і підсобними цехами.

Забороняється зберігати у виробничих приміщеннях миючі, дезінфікуючі засоби, відходи, інвентар, які не мають безпосереднього відношення до виробничого процесу. Зберігання протирального інвентарю, миючих та дезінфікуючих засобів здійснюється в окремих приміщеннях. Інвентар (відра, щітки тощо) повинен бути маркерований і закріплений за виробничими, допоміжними і підсобними цехами.

Підготовка приміщень до роботи включає комплекс заходів, що складається з вологого прибирання приміщень, дезінфекції стін, підлоги та інших поверхонь, які здійснюються з метою зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень і досягнення потрібного рівня чистоти приміщень. Вологе прибирання розділяють на щоденне та генеральне, яке для приміщень класу чистоти С і В проводиться один раз на зміну.

Щоденне прибирання здійснюють з метою звільнення виробничих приміщень від виробничих відходів, розсипаних порошків та інших речовин і механічних забруднень шляхом обробки поверхонь мийним засобом.

Генеральне прибирання приміщень проводять 1 раз на 5 днів (в день профілактики обладнання) або негайно на вимогу бактеріолога у випадку виявлення мікробної контамінації. Воно проводиться з метою масштабного та одноразового глибокого очищення всіх елементів, із яких складається об'єкт, тобто підлоги, стін, дверей, стелі та всіх поверхонь даного приміщення. Також проводять обробку дезрозчином шляхом зрошення поверхонь [42].

Виробництво пробіотичного препарату «Лактобактерин» здійснюється упродовж 270 днів. Площі виробничих приміщень, в яких здійснюють наступні етапи:

- Приміщення, де відбуваються етапи культивування біологічного агента (КБА). В даному приміщенні встановлено ферментер (1000 л), посівний апарат (100 л), інокулятор (10 л), збірники, автоклав та інше

обладнання. Оптимальна площа виробничого приміщення становить 64 м^2 (9х7 м);

- Приміщення, де відбувається сепарування біомаси (СБ). В даному приміщені встановлений збірник (250 л) та сепаратор (об'єм ротора 15 л). Оптимальна площа виробничого приміщення становить 30 м^2 (6х5 м);
- Приміщення, де відбувається приготування захисного середовища та його змішування з біомасою бактерій (ЗСіСБ). В даному приміщені встановлені два реактора-змішувача (10 та 20 л). Оптимальна площа виробничого приміщення становить 24 м^2 (6х4 м);
- Приміщення, де відбувається сушіння та подрібнення (СП). В даному приміщені встановлені ліофільна сушарка та валкова дробарка. Оптимальна площа виробничого приміщення становить 37,5 м^2 (7,5х5 м);
- Приміщення, де відбувається фасування, пакування і маркування (ФПМ). В даному приміщені встановлена машина для фасування, пакування і маркування. Оптимальна площа виробничого приміщення становить 66 м^2 (11х6 м).

Приблизний план приміщень наведений на рис. 5.3.

Висота стін кожного приміщення– 4 м. Загальна площа стін становить 584 м^2, а загальна площа підлоги 217,5 м^2:

- Приміщення КБА: ((9*4) + (7*4))*2 = 128 м^2. Площа підлоги 64 м^2;
- Приміщення СБ: ((6*4) + (5*4))*2 = 88 м^2. Площа підлоги 30 м^2;
- Приміщення ЗСіСБ: ((5*4) + (4*4))*2 = 72 м^2. Площа підлоги 20 м^2;
- Приміщення СП: ((7,5*4) + (5*4))*2 = 160 м^2. Площа підлоги 37,5 м^2;
- Приміщення ФПМ: ((11*4)+(6*4))*2 = 136 м^2. Площа підлоги 66 м^2.

Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати (*табл. 5.1*).

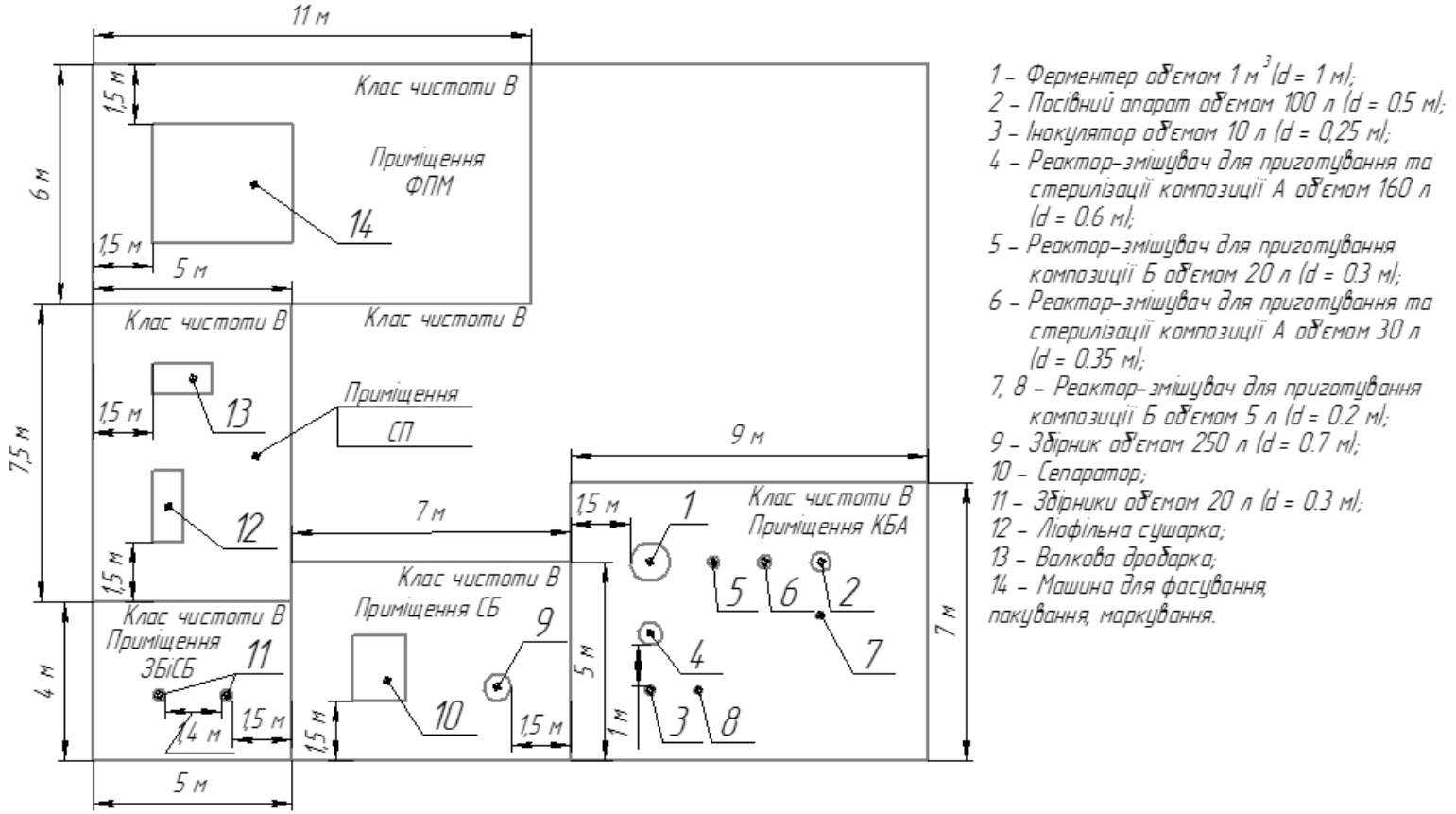


Рис. 5.3. План виробничих приміщень **(класи чистоти В)** для етапів культивування, а також виділення та очищення біомаси *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627.

Варто зазначити, що площа приміщення зумовлена тим, що відстань між апаратами, відповідно до вимог, має становити не менше 1 м і від стін не менше 1,5 м.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва пробіотику за культивування *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627

Обладнання	**Геометричний об'єм, м^3**	**Діаметр, м**
Ферментер	1	1
Реактор-змішувач для приготування та стерилізації *композиції А*	0,16	0,6
Реактор-змішувач для приготування *композиції Б*	0,02	0,3
Посівний апарат	0,1	0,5
Реактор-змішувач для приготування та стерилізації *композиції А*	0,03	0,35
Реактор-змішувач для приготування *композиції Б*	0,005	0,2
Інокулятор	0,01	0,25
Реактор-змішувач для приготування *композиції Б*	0,005	0,2
Збірник для культуральної рідини	0,25	0,7
Сепаратор	3,14	-
Реактор-змішувач для приготування захисного середовища	0,02	0,3
Реактор-змішувач для здійснення стабілізації біомаси	0,02	0,3
Ліофільна сушарка	2,45	-
Валкова дробарка	1,44	-
Машина для пакування	31,5	-
Всього	**40,135 м^3**	

Загальний об’єм обладнання для культивування, а також виділення та очищення біомаси становить 40,135 м^3. А кількість виробничих циклів відповідно 193. Обладнання необхідно ретельно мити та дезінфікувати всередині і зовні перед кожним виробничим циклом, тобто 193 рази на рік (кількість циклів на рік).

Тоді загальний об’єм миття апаратури становитиме:

$$40{,}135 \cdot 193 = 7746{,}055 \text{ м}^3$$

Площа підлоги становить 217,5 м^2. Миття здійснюється кожного дня (270 разів, відповідно кількості трудоднів), генеральне прибирання здійснюється 1 раз на 5 днів.

Узагальнений розрахунок площі поверхонь, які потрібно мити та/або дезінфікувати наведено в табл.5.2.

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об’єкту за весь період виробництва пробіотичного препарату

Об'єкт миття та/або дезинфекції	Площа (об’єм) оброблюваного об’єкту, м^2 (м^3)	Кількість процесів миття та/або дезинфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об’єм) миття та/або дезинфекції об’єкту за весь період виробництва, м^2 (м^3)
Обладнання, інвентар, комунікації	40,135	193	7746,055
Підлога	217,5	270	58725
Стіни, двері	584	54	31536

Обґрунтування вибору мийних та дезинфікуючих засобів.

Щоб обрати миючий та дезинфікуючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м^2 затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезинфікувального засобу (згідно з методичними

рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Вибір мийних та дезинфікуючих засобів залежить насамперед від об'єкта, який буде піддаватися обробці, тобто для обладнання, комунікацій та інвентарю, або для стін, стелі та підлоги.

Враховуючи такі вимоги, до миючих та дезінфікуючих засобів, як рівень антимікробної активності, необхідність забезпечувати повне видалення механічного, білкового та жирового забруднень шляхом їх диспергування та емульгування, а також бути найбільш ефективними, безпечними і недорогими, було проаналізовано наступні миючі та дезінфікуючі засоби: Дезекон ОМ, Дезекон, Vasept Forte, Славін-Дельта, Віндез ЧАС-С та Санікон. Дані мийно-дезинфікуючі засоби дозволені до використання на біотехнологічних та фармацевтичних виробництвах згідно «Державного реєстру дезінфекційних засобів» (2020) [44].

Вартість концентратів мийних та дезинфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведені в табл. 5.3.

Проаналізувавши дані, наведені в табл. 5.3, можна зробити такі висновки:

- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати мийний засіб «Vasept forte» та «Дезекон».

«Vasept forte»: Засіб володіє мийно-дезинфікуючими властивостями, що дає змогу заощадити кошти. Видаляє механічні, білкові, жирові забруднення із зовнішніх поверхонь. Засіб має мийні, очищувальні та дезодоруючі властивості, не пошкоджує об'єкти, що піддаються знезараженню (вироби, з пластмас, гуми, металу, нержавіючої сталі, міді, алюмінію, свинцю і олова, скла та інших матеріалів), не фіксує на поверхнях об'єктів обробки забруднення органічного походження, не залишаючи плям та нальоту.

Склад даного засобу є комбінованим, що забезпечує більш ефективне очищення та дезінфекцію у порівнянні з однокомпонентними засобами.

Таблиця 5.3

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезинфікувальних засобів для виробництва пробіотичного препарату

Назва миючого/дезинфікую-чого засобу	Об'єкт миття та/або дезинфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об’єм) миття та/або дезинфекції об’єкту за весь період виробництва, $м^2$ (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезинфікувального засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезинфекції за весь період виробництва, грн
Дезекон ОМ*	Обладнання, інвентар, комунікації	0,5	774605	154915	441[1]	341587
Дезекон*	Обладнання, інвентар, комунікації	0,5	774605	154915	255[2]	197516
Vasept Forte*	Обладнання, інвентар, комунікації, тара	0,5	774605	154915	201[3]	155689
Славін-Дельта*	Стіни, підлога, двері, інвентар, тара	0,5	90261	9026	546[4]	24640
Віндез ЧАС-С*	Стіни, підлога, двері, інвентар, тара	0,2	90261	9026	300[5]	5415
Санікон*	Стіни, підлога, двері, інвентар, тара	0,2	90261	9026	255[6]	4603

* - засоби для дезінфекції було взято з Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 рік.

Примітки: Ціни миючих та/або дезінфікуючих засобів станом на 15.05.2020**:**

1 - https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev

2. https://uk.interdez.com.ua/product/dezekon-unvcpd

3. https://prom.ua/p917105012-vasept-forte.html

4. https://lavernamarket.com.ua/p37053449-slavin-delta-dezinfitsiruyuschee.html

5. https://prom.ua/p657394633-vindez-chas-dezinfektsiya.html

6. https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanikon-interdez-kiev

Засіб «VASEPT forte», має антимікробну активність до грамнегативних та грампозитивних бактерій (включаючи туберкульоз, небезпечних та особливо небезпечних (чуми, холери, туляремія, черевний тиф, клостридії, легіонельоз), має віруліцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості.

Засіб дезінфікуючий «VASEPT forte», за параметрами гострої токсичності відповідно до ГОСТ 12.1.007-76 належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру та при введенні у шлунок (4 клас небезпеки) [45].

«Дезекон»: Рідкий концентрований лужний миючий дезінфікуючий засіб з посиленою мийною дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних і генеральних прибирань і санітарної обробки.

Діючими речовинами в ньому виступають комплекс 4-х четвертинних амонієвих солей (не менше 5,5%) і синергічно діючих допоміжних компонентів, які поєднують дезінфікуючу, виражену мийну і дезодоруючу дію. pH засобу 12,4 ± 0,5.

Даний засіб ефективний проти грам + і грам- бактерій (включаючи *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *P.aeruginosa* (*Antibiotic resistant*), та ін.), вірусів, патогенних грибів і цвілевих грибів.

Має IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини за ДСТУ 12.1.007-76) при інгаляційній та нашкірній дії, не містить летючих і екологічно неблагополучних компонентів, не подразнює органи дихання і очі, має

приємний запах. Не має сенсибілізуючої, мутагенної, тератогенної, гонадотоксичної і канцерогенної дії [46].

- для миття та дезинфекції стін, підлоги, та дверей – «Віндез ЧАС – С» та «Санікон».

«Віндез ЧАС-С»: Даний засіб має мийно-дезинфікуючі властивості.

Засіб має високу антимікробну активність завдяки комбінованому складу: четвертинно амонієві сполуки і спирт. [47].

«Санікон»: Рідкий концентрований лужний миючий дезинфікуючий засіб з посиленою мийною дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних і генеральних прибирань і санітарної обробки.

Миючий дезинфікуючий засіб «Санікон» володіє широким спектром антимікробної активності, має бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дії.

Має IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76). Не містить альдегідів, фосфатів, активного хлору, кисню та інших агресивних, високотоксичних, летких і екологічно небезпечних компонентів. Засіб дозволено для застосування в присутності пацієнтів та персоналу, що не бере участь в проведенні дезінфекції, не дратує органи дихання і очі [48].

Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 міс для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

5.1.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Lactobacillus plantarum 337Д УКМ В-2627 вирощують на рідкому поживному середовищі наступного складу, г/л:

- дріжджовий екстракт - 5;
- м’ясний екстракт – 10;
- гідролізат казеїну –10;
- глюкоза – 20;
- твін 80 – 1,0;

- ацетат натрію – 5,0;
- цитрат амонію – 2,0;
- K_2HPO_4 – 2,0;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2;
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,05 [8].

Вирощування посівного матеріалу проходить на середовищі аналогічного складу.

Для забезпечення ефективного процесу в посівному апараті об'ємом 70 л, де основні та фосфорні солі стерилізують разом, з метою уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію pH розчину з солями доводять до значення 4-4,5 6%-вим розчином соляної кислоти.

Але у зв'язку з тим, що для вирощування культури pH повинно бути на нейтральному рівні (pH = 7.26), то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище стабілізують стерильним 6%-вим розчином NaOH.

Для забезпечення точного та економічно-вигідного процесу ми розрахували вміст та визначили особливості приготування деяких компонентів поживного середовища (вітамінний розчин, HCl, NaOH) на 3 етапах виробництва. Дані наведені в табл.5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних розчинів

Об'єм поживного середовища, л	**HCl (6%)**		**NaOH (6%)**	
	Об'єм, мл	**Особливості приготування**	**Об'єм, мл**	**Особливості приготування**
0,54	-	-	-	-
6,1	12	У колбі на 100 мл	12	У колбі на 100 мл
61	122	У колбі на 250 мл	122	У колбі на 250 мл
640	1280	У колбі на 2 л	1280	У колбі на 2 л

Приготування і стерилізація 0,54 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

На даному етапі вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці необхідним є приготування поживного середовища (≈ 0,54 л), яке необхідно стерилізувати в автоклаві. Отже для стерилізації обираємо автоклав з вертикальним завантаженням, об'ємом 10 л. Склад поживного середовища поділяємо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: глюкоза, гідролізат казеїну, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт та твін 80 (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 ^{o}C);

Композиція Б: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ (режим стерилізації 131 ^{o}C, 40 хв. та тиску 0,15 МПа);

Композиція В: K_2HPO_4, ацетат натрію, цитрат амонію (режим стерилізації 131 ^{o}C, 40 хв. та тиску 0,15 МПа).

Компоненти, що входить до композиції А є термолабільними, тому необхідним є забезпечення м'якого режиму стерилізації. Солі, які наявні в складі середовища розділено на композицію Б та В, з метою унеможливлення утворенню нерозчинних фосфатів магнію.

Приготування і стерилізація 6,1 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

На цьому етапі об'єм середовища, що необхідний для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі, становить 6,1 л. Поживне середовище поділяємо на такі композиції:

Композиція А: глюкоза, гідролізат казеїну, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт та твін 80 (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 ^{o}C);

Композиція Б: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, K_2HPO_4, ацетат натрію, цитрат амонію (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 ^{o}C).

Компоненти, що входить до композиції А є термолабільними, тому необхідним є забезпечення м'якого режиму стерилізації. Солі, які наявні в

складі середовища на етапі вирощування інокуляту з'єднують в одну композицію Б з метою зменшення кількості обладнання для їх стерилізації. З метою уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію pH розчину з солями доводять до значення 4-4,5 6%-вим розчином соляної кислоти. Але оскільки для вирощування культури pH повинно бути на нейтральному рівні (pH = 7), то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище необхідним є його стабілізація стерильним 6%-вим розчином NaOH.

Приготування і стерилізація 61 л поживного середовища для культивування в посівному апараті

На цьому етапі об'єм середовища, що необхідний для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі, становить 61 л. Поживне середовище поділяємо на такі композиції:

Композиція А: глюкоза, гідролізат казеїну, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт та твін 80 (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 ^{o}C);

Композиція Б: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, K_2HPO_4, ацетат натрію, цитрат амонію (режим стерилізації 131 ^{o}C, 40 хв. та тиску 0,15 МПа).

Компоненти, що входить до композиції А є термолабільними, тому необхідним є забезпечення м'якого режиму стерилізації. Солі, які наявні в складі середовища на етапі вирощування інокуляту з'єднують в одну композицію Б з метою зменшення кількості обладнання для їх стерилізації. З метою уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію pH розчину з солями доводять до значення 4-4,5 6%-вим розчином соляної кислоти. Але оскільки для вирощування культури pH повинно бути на нейтральному рівні (pH = 7), то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище необхідним є його стабілізація стерильним 6%-вим розчином NaOH.

Приготування і стерилізація 640 л поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері

На цьому етапі об'єм середовища, що необхідний для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі, становить 640 л. Поживне середовище поділяємо на такі композиції:

Композиція А: глюкоза, гідролізат казеїну, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт та твін 80 (стерилізація 30 хв., тиск 0,05 МПа при температурі 112 ^{o}C);

Композиція Б: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, K_2HPO_4, ацетат натрію, цитрат амонію (режим стерилізації 131 ^{o}C, 40 хв. та тиску 0,15 МПа).

Компоненти, що входить до композиції А є термолабільними, тому необхідним є забезпечення м'якого режиму стерилізації. Солі, які наявні в складі середовища на етапі вирощування інокуляту з'єднують в одну композицію Б з метою зменшення кількості обладнання для їх стерилізації. З метою уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію pH розчину з солями доводять до значення 4-4,5 6%-вим розчином соляної кислоти. Але оскільки для вирощування культури pH повинно бути на нейтральному рівні (pH = 7), то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище необхідним є його стабілізація стерильним 6%-вим розчином NaOH.

5.2. Обгрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

При виробництві препарату «Лактобактерин» цільовим продуктом є біомаса *Lactobacillus plantarum*, яка складає основу даного пробіотичного препарату. Він використовується у комплексній терапії для лікування захворювань кишечника та неспецифічних запальних захворюваннях жіночих статевих органів.

Початковим етапом виділення у виробництві є відокремлення біомаси від культуральної рідини одним із методів, що застосовуються в біотехнології. Цей етап здійснюється з метою позбавлення біомаси від

залишків поживного середовища та метаболітів, які утворилися під час попередніх етапів біосинтезу.

Наступним етапом технологічного процесу є стабілізація біомаси шляхом додавання до неї захисного середовища. Ця операція здійснюється з метою попередження втрат життєздатних клітин молочнокислих бактерій на наступних стадіях виробництва.

Далі необхідним етапом є висушування отриманої біомаси. Даний етап здійснюється з метою збільшення в подальшому терміну зберігання клітин бактерій та надання їм лікарської форми.

Для забезпечення відповідних якісних характеристик, за етапом висушування біомаси слідує стадія подрібнення та просіювання до частинок певного розміру.

На завершальних етапах виробництва необхідним є проведення операцій фасування, пакування та маркування, що дозволить отримати відповідний товарний вигляд пробіотичного препарату. На сьогодні високотехнологічне обладнання дозволяє здійснювати ці операції швидко та автоматизовано, що дозволяє ефективно здійснювати виробничий процес.

Отже, виходячи з усього вище сказаного, можна стверджувати, що технологічний процес отримання (виділення) біомаси *L. plantarum* буде складатися з наступних етапів (*рис. 5.4*):

1) відокремлення біомаси від культуральної рідини, що була отримана на попередніх стадіях біосинтезу;
2) додавання захисного середовища до отриманої, після відділення, біомаси;
3) процес сушіння;
4) просіювання висушеної біомаси;
5) етап фасування, пакування та маркування цільового продукту.

У пробіотичному препараті «Лактобактерин» у ролі активного фармацевтичного інгредієнту виступають ліофілізовані клітини *L. plantarum*

(далі АФІ). Для забезпечення якості АФІ на всіх стадіях виробництва слід встановити відповідний контроль. Також для зведення до мінімуму ризику контамінації слід використовувати належне обладнання та проводити контроль навколишнього середовища.

Рис. 5.4. Технологічні етапи виробництва пробіотичного препарату

Згідно СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» обладнання, що використовується при виробництві даного препарату має бути належним чином спроектоване, мати відповідні розміри і розташовуватися відповідно до свого призначення і таким чином, щоб персонал міг здійснювати очищення, санітарну обробку (за необхідності) і технічне обслуговування.

При можливості слід використовувати закрите 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 вимірювальне та випробувальне обладнання, яке є критичним для забезпечення якості проміжної продукції чи АФІ, слід калібрувати відповідно до письмових методик і встановленого графіка [49].

5.2.1. Обґрунтування вибору способу відокремлення біомаси

Після процесу біосинтезу отримана культуральна рідина складається із залишків компонентів поживного середовища, метаболітів та біомаси молочнокислих бактерій. Для відокремлення біомаси на сьогоднішній день застосовуються такі методи:

- фільтрація;
- флотація;
- центрифугування;
- сепарація.

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 дане обладнання повинно мінімально впливати на активність, цілісність клітин та кількісний склад бактерій, які підлягають відділенню від культуральної рідини [49].

Фільтрування – це процес відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження суспензії через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів.

Принципова схема роботи фільтру проста: суспензія потрапляє на фільтруючу перегородку, при цьому рідка фаза проходить фільтруючий матеріал, а тверда фаза затримується на фільтруючому матеріалі у вигляді шару осаду. Для фільтрування використовують фільтр-преси різної конструкції: барабанні вакуум фільтри (*рис. 5.5*), стрічкові фільтр-преси (*рис. 5.6*), та інші конструкції.

Процес фільтрування є менш енергоємний, проте одночасно і менш ефективний порівняно з іншими методами.

Рис 5.5. Барабанний вакуум фільтр.

Рис 5.6. Стрічковий фільтр-прес.

Недоліки процесу фільтрування полягають у великих втратах біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, через що пори засмічуються та потребують заміни чи регенерації [50].

Флотація – виділення з рідких середовищ твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флотація заснована на прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу. Флотація поділяється на :

- механічну – у рідину занурюється пристрій, який дозволяє всмоктувати повітря з атмосфери за рахунок обертового руху рідини (*рис.5.7, а*);
- пневматичну – продування повітря крізь дрібнопористі тканини (*рис.5.7, б*);
- вакуумну –пухирці повітря утворюються з розчинених у воді газів при створенні розрідження;
- електролітичну –в камері флотатора розташовуються 2 електроди, в результаті електролізу води утворюються газова фаза і відбувається процес флотації.

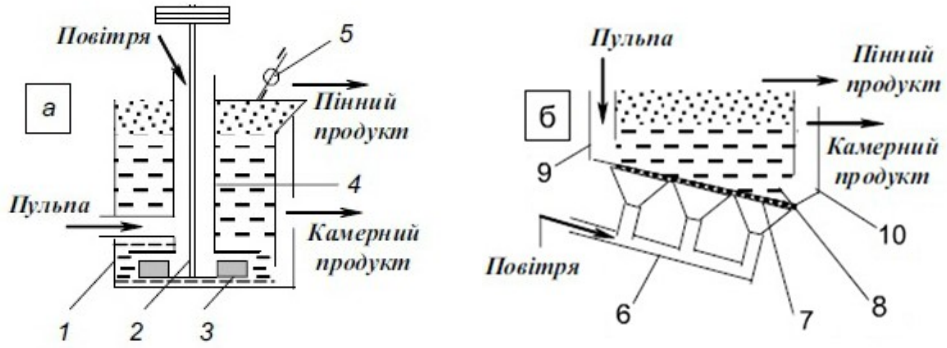


Рис.5.7. Схеми основних типів флотаційних машин: а – механічної; б – пневматичної. 1 – камера; 2 – вал; 3 – імпелер; 4 – повітряна труба; 5 – пінознімач; 6 – повітряна труба; 7– пориста перегородка; 8– конічна частина камери; 9 – завантажувальний карман; 10 – розвантажувальний карман.

Перевагами методу є його економічність, висока продуктивність і можливість використання в безперервних процесах.

Недоліком флотації являються великі втрати біомаси [51].

Центрифугування – процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Машини для здійснення таких операцій називаються центрифугами, які підрозділяються на фільтруючі (*рис. 5.8*), осаджувальні (*рис. 5.9*) і комбіновані (осаджувально-фільтруючі).

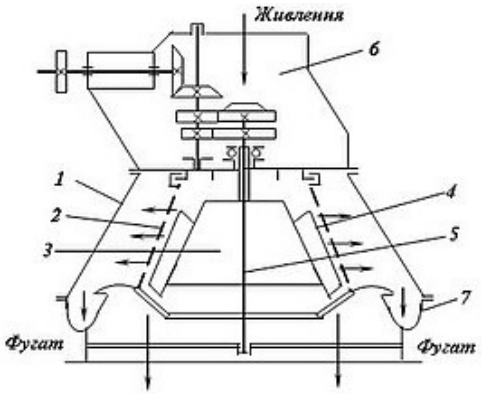


Рис. 5.8. Центрифуга фільтруюча шнекового типу: 1 – корпус центрифуги; 2 – фільтруючий ротор; 3 – корпус шнека; 4 – шкребки; 5 – головний вал; 6 – завантажувальний циліндр; 7 – жолоб для фугату.

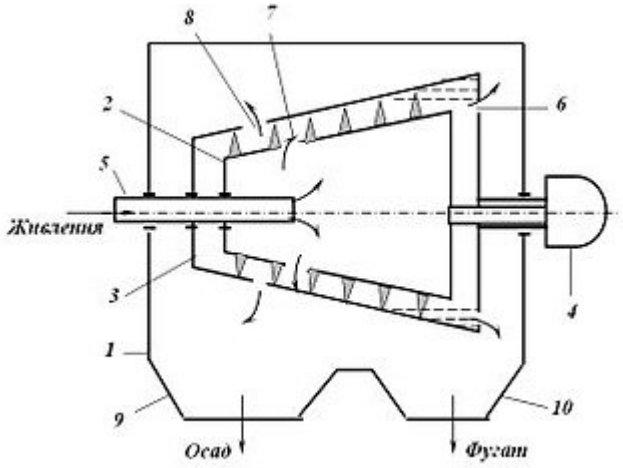


Рис.5.9. Осаджувальна центрифуга: 1 – корпус; 2 – шнек; 3 – ротор; 4 – планетарно-диференціальний механізм; 5 – живильна труба; 6 – зливні вікна; 7 – радіальні отвори; 8 – розвантажувальні отвори; 9 – камера осаду; 10 – камера фугату.

Метод центрифугування заснований на дії відцентрової сили на неоднорідної системи, що складається з двох та більше фаз. В промислових установках розділення під дією відцентрових сил застосовують для розділення часточок розміром від 0,5 мкм до 25 мм. При розділенні суспензії у фільтруючих центрифугах в роторі під дією відцентрових сил відбувається фільтрація рідини через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази; рідка фаза проходить через сито і

потім через отвори в роторі викидається в кожух центрифуги, а осад відвантажується або під час обертання ротору, або після його зупинки.

Недоліки процесу центрифугування полягають в:

- меншій ефективності у порівнянні з сепаруванням [52].

Сепарація –процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силу процесу являється відцентрова сила.

Ефективність сепарування пропорційна частоті обертів барабану, діаметру барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз.

По технологічному призначенню сепаратори поділяються на такі типи:

- фільтруючі для розділення двох взаємно нерозчинних розчинів з одночасним виділенням твердої фази;
- осаджувальні для відділення твердої фази від рідкої;
- фільтруючо-саджувальні можуть налаштовуватися як фільтруючі або як очисні в залежності від положення ротору;
- згущуючі для підвищення концентрації зважених чи колоїдних компонентів суспензії з одночасним розділенням у випадку емульсії;
- розподільчі для розподілення зважених компонентів суспензії по розміру або густині часток [53,54].

Рис. 5.10. Сепаратор-очищувач.

Переваги:

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

Отже, проаналізувавши всі способи відокремлення біомаси від культуральної рідини доцільним буде обрати метод сепарування. За його використання втрати біомаси найменші, достатньо висока ефективність та є можливість автоматизувати процес.

5.2.2. Обґрунтування способу попередньої обробки біомаси бактерій

Важливим етапом технологічного процесу виробництва пробіотичних препаратів є стабілізація біомаси бактерій після процесу відділення від культуральної рідини. Відразу після виробничого біосинтезу бактеріальні клітини, які знаходились в культуральній рідині, потребують захисту. За відсутності захисних речовин клітини зазнають значних змін на наступних етапах, що може супроводжуватись руйнуванням клітинних структур і втратою життєздатності. При цьому необхідна стабільність, не тільки з точки зору життєздатності, але й з точки зору метаболічної та функціональної активності, для підтримки бажаних сенсорних властивостей та забезпечення заявленої користі пробіотичних препаратів для здоров'я протягом усього терміну зберігання [55].

У промисловості найчастіше застосовують комбіновані захисні середовища, що містять сахарозу, лактозу, цитрат, глютамат натрію, знежирене молоко, сироватку з додаванням різних вуглеводів, багатоатомних спиртів та солей. Захисні середовища попереджують пошкодження клітин під час наступних етапів виробництва, зокрема процесу сушіння. Так як кінцевою формою препарату «Лактобактерин» є ліофільно висушений порошок, клітини необхідно захистити від впливу низьких та високих температур у процесі сублімаційного сушіння. Кріопротектори та ліопротектори (речовини, які входять до захисного середовища) відповідно уповільнюють швидкість росту льоду за рахунок збільшення в'язкості

розчину та стабілізують ліпідну двошарову структуру клітинної мембрани за відсутності води [56].

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 даного способу є можливість обробки невеликих кількостей утвореної культуральної рідини та достатньо складна організація процесу [57].

Отже, проаналізувавши способи стабілізації біомаси бактерій, найбільш економічно доцільним і дієвим є додавання захисного середовища, що містить кріо- та ліопротектори.

5.2.3. Обгрунтування вибору способу приготування кінцевої форми препарату

Кінцевою формою препарату «Лактобактерин» є висушений порошок, оскільки при використанні даної форми стабільність та якість препарату майже не змінюється упродовж усього терміну зберігання препарату.

Для отримання порошкоподібних препаратів можуть застосовуватися наступні методи:

- сушіння за допомогою розпилювальної сушарки;
- вакуумна сушка;
- сублімаційна сушка (ліофілізація) [58].

Обладнання, яке використовується для сушіння повинно мінімально впливати на якість АФІ, зокрема, забезпечувати максимально можливу кількість живих та не пошкоджених клітин пробіотичних бактерій [49].

Сушіння за допомогою розпилювальної сушарки (*рис. 5.11*) - це швидкий та економічно вигідний метод сушіння, за допомогою якого можна отримати сухі частинки порошку з бажаними властивостями, такими як хороша текучість, питомий вміст залишкової вологи та рівномірний розподіл

форми та розміру. Цей процес можна розділити на чотири етапи. По-перше, рідкий продукт за допомогою механічних форсунок або розпилюючих високообертових дисків диспергується на дрібні краплі. Потім утворений спрей стикається з нагрітим газом в сушильній камері. Третя фаза процесу сушіння розпиленням включає висушування крапель та утворення частинок. Після цього тверді частинки відокремлюються від сушильного повітря. В основному важкі частинки відокремлюються внаслідок гравітаційної сили, а дрібні частинки – за допомогою циклонів [59].

Рис. 5.11. Розпилювальна сушарка.

Під час сушіння розпилюванням на клітини пробіотиків діють різні навантаження, які включають тепловий стрес, зневоднення, напругу зсуву, осмотичний та окислювальний стрес, що призводять до інактивації та втрати життєздатності клітин [60].

Хоча різні фактори стресу можуть сильно впливати на здатність виживання пробіотиків під час і після сушіння розпиленням, більшість цих факторів можна, принаймні частково, подолати раціональним підбором відповідних стратегій захисту. Загалом можна виділити три основні стратегії захисту: додавання захисних агентів, адаптація параметрів процесу та попереднє напруження клітин пробіотиків до висушування. Ці стратегії

впливають не тільки на життєздатність пробіотиків відразу після висушування, але і під час зберігання [61].

Перевагами цього методу сушіння є швидкість, безперервність процесу, відносна легкість організації та рентабельність процесу.

Недоліком даного способу сушіння являється контакт висушуваної речовини з високою температурою та як наслідок інактивація клітин мікроорганізму, що входить у продукт.

Наступним способом висушування є вакуумна сушка (*рис. 5.12*). При її використанні зразки сушать шляхом випаровування рідини. Сушіння відбувається періодично, тобто у сушильну шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, і починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують коли матеріал матиме потрібну вологість, і після чого готовий сухий матеріал вивантажують.

При використанні даного методу сушіння присутній стрес дегідратації, який може спричинити серйозні втрати життєздатності клітин. Аналіз вакуумно-висушених клітин за допомогою атомно-силової мікроскопії та інфрачервоної спектроскопії чітко показав, що основним місцем пошкодження є клітинна стінка [62].

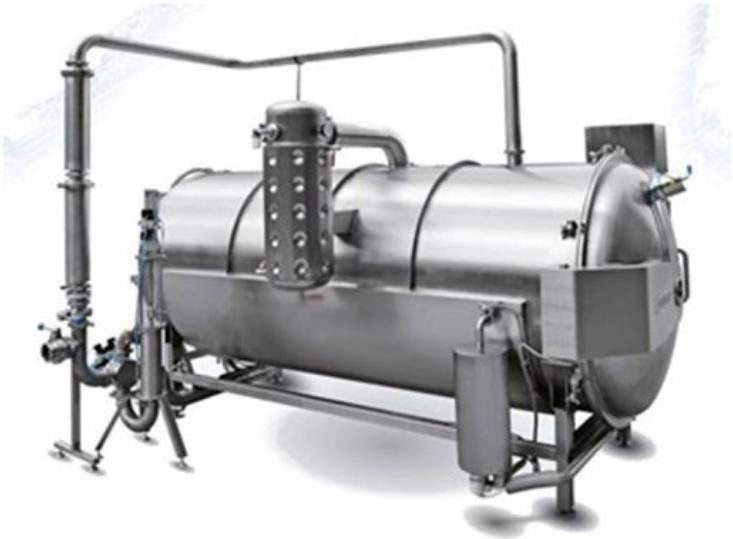


Рис. 5.12. Вакуумна сушарка.

Основні стратегії захисту пробіотиків від вакуумної сушки включають додавання захисних агентів або зміну параметрів процесу.

Перевагами цього методу є робота за порівняно нижчих температур.

Недоліком даного процесу являється можлива інактивація клітин, зокрема внаслідок дегідратації та впливу температур.

Ліофілізація - найбільш зручний і широко застосовуваний спосіб видалення води для підвищення стабільності при зберіганні пробіотиків. Цей процес можна розділити на 3 етапи: заморожування, первинна сушка та вторинна сушка. На першому етапі відбувається власне заморожування продукту при низьких температурах. На етапі первинної сушки заморожену воду видаляють сублімацією під вакуумом, а на вторинній стадії сушіння незамерзлу воду видаляють десорбцією. Метод ліофілізації дозволяє отримувати сухі тканини, препарати, продукти тощо без втрати їх структурної цілісності та біологічної активності. При ліофілізації більшість білків не піддається денатурації і може довго зберігатися при помірному охолодженні (близько 0°С). 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 застосовують 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 [63].

Переваги ліофілізації:

- живі клітини, які поступають на ліофілізацію не інактивуються в процесі;
- збереження дисперсної фази препарату;
- висушену продукт можна зберігати досить тривалий термін;
- відсутність впливу високих температур [58].

Отже, проаналізувавши способи сушіння біомаси бактерій, найбільш доцільним є використання ліофілізації, оскільки, по-перше, після процесу сушіння залишається більша кількість життєздатних бактерій у порівнянні з іншими способами і, по-друге, стабільність біомаси висушеної таким чином майже не змінюється упродовж всього терміну зберігання.

5.2.4. Обґрунтування способу подрібнення

Після сушіння біомаси бактерій, до якої попередньо було внесене захисне середовище, на виході отримуємо суцільний твердий корж, що містить 2-4% води. Тому необхідною технологічною операцією є подрібнення даних коржів з метою отримання тонкодисперсного, стійкого порошку [64].

Для процесу подрібнення слід використовувати закрите обладнання або обладнання, що герметично закривається. Поверхні, що контактують з АФІ не повинні впливати на якість продукту. Під час процесу подрібнення обладнання повинно забезпечувати розмір часток у заданих межах передбачених документацією [49].

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 щокові, конусні, валкові, молоткові, барабанні; бігуни та кульові, стрижневі, вібраційні, колоїдні 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 і 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 [50]. Далі розглянемо декілька найрозповсюджених машин для середнього та дрібного подрібнення.

Щокові дробарки (*рис.5.13)* відносяться до групи машин з періодичним стисканням і вільним розвантаженням продукту під впливом сили тяжіння. Вони складаються з двох поверхонь (щік), розташованих під невеликим кутом, що зближуються в нижній частині.

Щокові дробарки застосовують для крупного і середнього дроблення твердих матеріалів і матеріалів середньої твердості. При дробленні в'язких матеріалів використовується додатковий ковзальний рух щоки, яка хитається, що полегшує розвантаження машини. Вони не займають багато місця та мають просту конструкцію [65].

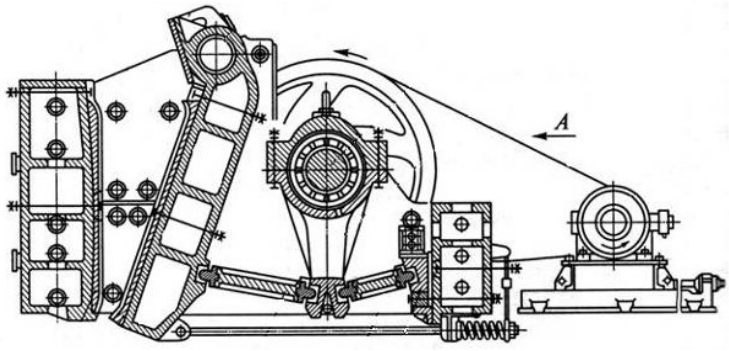


Рис. 5.13. Щокова дробарка з простим рухом рухомої щоки [64]

Молоткові дробарки. Для дрібного і тонкого подрібнення використовуються молоткові дробарки, в яких процес подрібнення здійснюється розбиванням. У молотковій дробарці (*рис.5.14*) сировина 2 подрібнюється від ударів молотків 4, які обертаються, а також унаслідок ударів матеріалу об ребристу поверхню стінок корпусу 3. Матеріал вивантажують крізь сито 1, величина отворів якого визначає ступінь подрібнення матеріалу. Ступінь подрібнення матеріалу залежить від швидкості обертання молотків. Колова швидкість на кінцях молотків

дробарки під час дроблення становить 70...90 м/с [52]. Недоліком даних дробарок є те, що під час подрібнення частина матеріалу може зазнати переподрібнення, внаслідок чого якість готового продукту знижується.

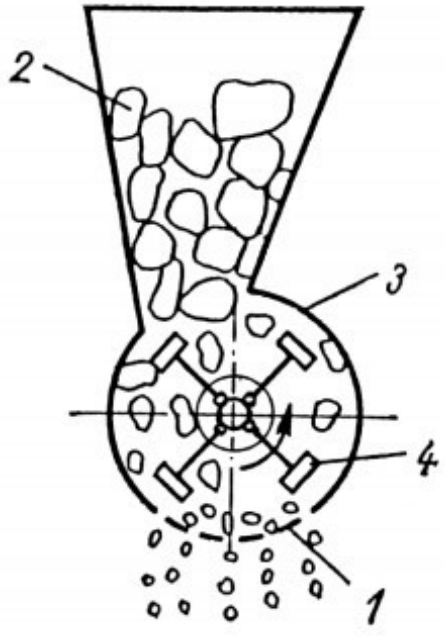


Рис.5.14. Схема молоткової дробарки [52].

Валкові дробарки (*рис. 5.15*). До найпоширеніших у харчовій промисловості дробарок давильної дії належать валкові дробарки. Їх використовують для середнього та тонкого дроблення. Принцип роботи даних дробарок полягає у тому, що матеріал живильником подається в дробарку через завантажувальну воронку, захоплюється валками, що обертаються з однаковою швидкістю назустріч один одному, дробляться і розвантажуються вниз під дробарку. Циліндрична поверхня валків може бути гладкою, зубчастою, ребристою або рифленою. Найкраще для дроблення м’яких та крихких матеріалів здійснюється саме дробарками з зубчатими валками. Валкові дробарки мають просту конструкцію, займають мало місця в приміщенні та надійні в експлуатації, однак є малопродуктивними [52,53].

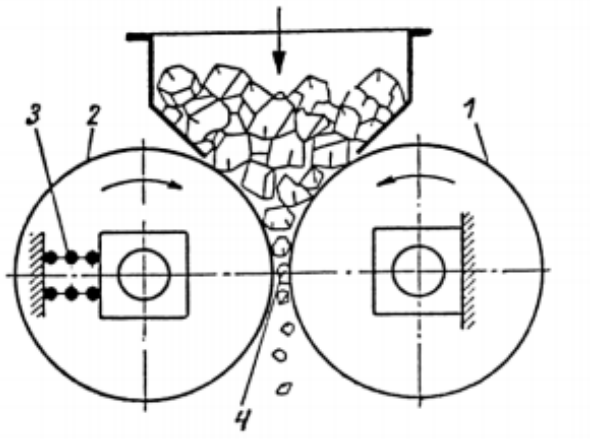


Рис. 5.15. Принципова схема валкової дробарки [53].

Отже, для процесу подрібнення найбільш доцільно використовувати валкові дробарки, які найбільш ефективні для матеріалів помірної твердості. Завдяки своїй компактності та надійності в роботі, мають переваги над іншими. Внаслідок однократного стиску матеріал не переподрібнюється.

5.2.5. Обґрунтування вибору первинної упаковки

При виборі первинної упаковки для пробіотичних препаратів слід враховувати те, що пробіотичні штами бактерій особливо чутливі до різних зовнішніх факторів, таких як:

- Температура;
- Вологість навколишнього середовища;
- Кисень.

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 [67].

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

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

Скло - це аморфний твердий матеріал, який зазвичай крихкий і оптично прозорий. Скло складається з піску, кальцинованої золи, гранул, кремнію, алюмінію, бору, калію, цинку тощо. Більшість склянок містять приблизно 70-72% ваги діоксиду кремнію (SiO_2). Флакони виготовлені зі скла мають ряд переваг:

- Вони доступні в різних формах і розмірах.
- Вони можуть витримувати коливання температури та тиску;
- Вони можуть захистити світлочутливі препарати від світла під час їх зберігання.
- Вони непроникні для атмосферних газів та вологи.
- Вони мають хороші захисні властивості [68].

Незважаючи на ряд переваг, випуск пробіотичних препаратів у скляних флаконах є дороговартісним, що в подальшому вплине на ціноутворення препарату.

Також у ролі первинної упаковки використовують пластикові флакони. Вони виготовляються переважно з поліетилену високої щільності (HDPE). Даний матеріал має високе співвідношення міцності до густини. Пластикові флакони, як і флакони зі скла, доступні в різних формах і розмірах, можуть витримувати коливання температури та можуть захистити світлочутливі препарати від світла під час їх зберігання. Недоліком даного типу упаковки є можливість проникнення вологи та кисню всередину упаковки впродовж терміну зберігання. Це в свою чергу погіршить якість препарату і призведе до зменшення кількості життєздатних клітин [69,70].

Наступним типом упаковки є багатошарові пакетики-саше. Найважливіша функція гнучкої ламінованої упаковки полягає в тому, щоб захистити препарат всередині пакета від попадання вологи та кисню, що і є важливим 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 забезпечує захист від вологи та кисню порівняно зі склом. Волого-бар'єрні властивості полімерів, покритих нею, також відіграють важливу роль. Серед полімерів, що додатково захищають від вологи, найбільш застосовуваними є поліпропілен (PP), і поліетилентерефталат. Сюди ж відносяться циклоолефінові сополімери, металоцени, нанокомпозити тощо [70].

Для захисту пробіотичного препарату використовують три варіанти упаковки (склад покриття вказаний від зовнішньої до внутрішньої сторони) (рис. 1) :

1 тип: папір / поліетилен (PE) / алюмінієва фольга / поліетилен (PE);

2 тип: поліетилентерефталат (ПЕТ) / алюмінієва фольга / поліетилен (ПЕ);

3 тип: поліетилентерефталат (ПЕТ) / алюмінієва фольга / покриття ущільнювачем з сополімером вуглеводневого вінілу (VMCH).

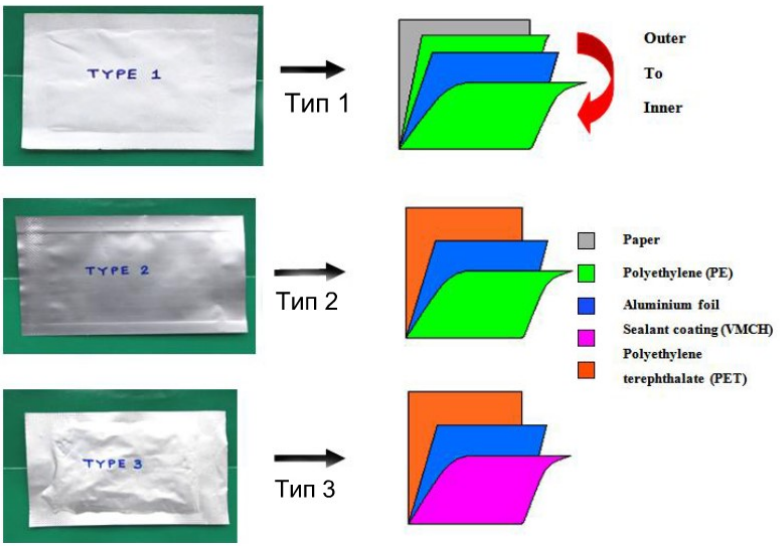


Рис.5.16. Типи пакетиків-саше за комбінування різних матеріалів.

Для визначення ефективності даних упаковок було проведено дослідження, при якому пробіотики зберігались у них при температурі 25°С та вологості повітря в межах 60% упродовж 6 місяців [72].

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 I, виявлено, що вміст вологи та кількість життєздатних найбільш стабільний на протязі всього періоду зберігання (*рис. 5.17*) [72].

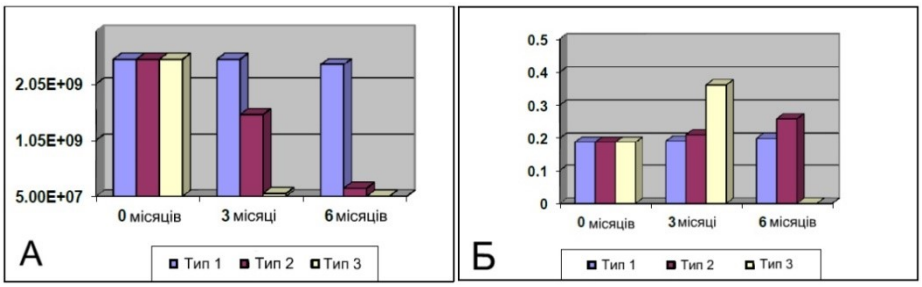


Рис. 5.17. Порівняльне дослідження стабільності пробіотичного препарту за використання різних типів комбінації матеріалів пакетику-саше: А – значення КУО/г; Б – значення вмісту вологи [72].

Виходячи з вище викладеної інформації у ролі первинної упаковки для пробіотичного препарату обираємо багатошарові пакетики-саше, які захищають від вологи, проходження кисню всередину упаковки та світла на рівні зі склом, але при цьому мають меншу вартість.

5.3. Обгрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту

5.3.1. Обґрунтування вибору складу захисного середовища

Ліофілізація є найбільш зручним і широко застосовуваним способом видалення води для підвищення стабільності зберігання пробіотиків. Цей процес можна розділити на 3 етапи: заморожування, первинна сушка та вторинна сушка. На всіх цих етапах клітинам потрібен додатковий захист. Адже, під час процесу заморожування утворюються кристали льоду, які можуть пошкодити клітини бактерій. На етапі первинної сушки заморожену воду видаляють сублімацією під вакуумом, а на вторинній стадії сушіння

незамерзлу воду видаляють десорбцією. Оскільки вода відіграє важливу роль у цілісності та стабільності клітин, її видалення може спричинити значне пошкодження поверхневих білків, клітинної стінки та клітинної мембрани, тим самим знижуючи їх життєздатність після висихання [58]. Для уникнення пошкодження та втрати життєздатності клітин застосовують захисні середовища.

Дієві захисні середовища мають два основні компоненти: ліопротектор, який стабілізує клітини при видаленні води, і матричний агент, який дозволяє всьому зразку зберігати свою форму під час і після обробки [73].

Дисахариди, такі як сахароза і трегалоза, є найбільш поширеними ліопротекторами. Позитивний вплив цукрів під час процесу сушіння полягає в тому, що у гідратованому стані конформація та цілісність білків та мембран стабілізуються 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 [74].

Добавки, що утворюють матрицю, які часто називають 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. Він може використовуватися як рослинного походження (наприклад, соєвий пептон) , так і тваринного (наприклад, желатин). Найбільш застосовуваним є желатин — це 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. 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 [75].

Отже, для захисту клітин пробіотиків обрано універсальне захисне середовище, яке включає всі необхідні компоненти: сахарозу, сухе знежирене молоко та для додаткового захисту желатин.

5.3.1.1. Обґрунтування співвідношення бактеріальної біомаси та захисного середовища

В попередньому підрозділі було обрано такий склад захисного середовища: сахароза, сухе знежирене молоко та для додаткового захисту желатин. Технологічно та економічно доцільно перевірити відповідну комбінацію, яка забезпечує ефективне захисне середовище для ліофілізації та визначити його кількість, яку необхідно додати до бактеріальної біомаси.

Було оцінено ефективність захисного середовища даного складу за різних концентрацій компонентів (*табл. 5.5*).

Таблиця 5.5

Компоненти кріозахисних середовищ, що використовуються для ліофільної сушки [38]

Номер середовища	Сухе знежирене молоко, %	Сахароза, %	Желатин, %
1	0	0	0
2	6	0	0
3	6	0	2
4	6	0	4
5	6	4	0
6	6	4	2
7	6	4	4
8	6	8	0
9	6	8	2
10	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/захисного середовища – 2:1 та 5:1. Таблиця 5.6 та 5.7 показує ступінь виживання бактерій після ліофілізації за різної комбінації і концентрації компонентів захисного середовища, та різному співвідношенні КР/ЗС [76].

Таблиця 5.6

Частота виживання *Lactobacillus plantarum* після ліофільної сушки та трьох місяців зберігання при 23°С та 4°С (співвідношення 2:1) [76]

Номер середовища	До сублімаційного сушіння	Після сублімаційного сушіння	Рівень виживання (%)	Зберігання при 4°С	Рівень виживання (%)	Зберігання при 23°С	Рівень виживання (%)
1	$(8.66\pm0.4)\times10^{11}$	$(2.6\pm0.4)\times10^{10}$	3	$(2.1\pm0.28)\times10^{6}$	0.008	$(1.31\pm0.08)\times10^{6}$	0.005
2	$(3.85\pm0.35)\times10^{11}$	$(7.7\pm0.18)\times10^{10}$	20	$(1.31\pm0.28)\times10^{10}$	17	$(6.9\pm0.04)\times10^{9}$	9
3	$(4.29\pm0.05)\times10^{11}$	$(8.16\pm0.33)\times10^{10}$	19	$(4.41\pm0.14)\times10^{10}$	54	$(7.34\pm0.28)\times10^{9}$	19
4	$(1.75\pm0.09)\times10^{11}$	$(3.33\pm0.04)\times10^{10}$	19	$(1.97\pm0.02)\times10^{10}$	59	$(9.99\pm0.14)\times10^{9}$	30
5	$(3.93\pm0.04)\times10^{11}$	$(2.44\pm0.04)\times10^{11}$	62	$(1.2\pm0.05)\times10^{11}$	49	$(5.12\pm0.28)\times10^{10}$	21
6	$(4.19\pm0.03)\times10^{11}$	$(2.66\pm0.04)\times10^{11}$	63	$(1.8\pm0.16)\times10^{11}$	68	$(6.86\pm0.07)\times10^{10}$	26
7	$(9.28\pm0.03)\times10^{10}$	$(5.85\pm0.28)\times10^{10}$	63	$(4.1\pm0.14)\times10^{10}$	70	$(1.63\pm0.07)\times10^{1}$	28
8	$(9.06\pm0.1)\times10^{10}$	$(7.07\pm0.08)\times10^{10}$	78	$(4.6\pm0.04)\times10^{10}$	65	$(1.97\pm0.02)\times10^{10}$	28
9	$(1.8\pm0.02)\times10^{11}$	$(1.5\pm0.02)\times10^{11}$	81	$(1.1\pm0.08)\times10^{11}$	73	$(4.95\pm0.07)\times10^{10}$	33
10	$(2.6\pm0.11)\times10^{11}$	$(2.23\pm0.04)\times10^{11}$	82	$(1.7\pm0.08)\times10^{11}$	76	$(8.25\pm0.05)\times10^{10}$	37

Таблиця 5.7

Частота виживання *Lactobacillus plantarum* після ліофільної сушки та трьох місяців зберігання при 23°С та 4°С (співвідношення 5:1) [76]

Номер середовища	До сублімаційного сушіння	Після сублімаційного сушіння	Рівень виживання (%)	Зберігання при 4°С	Рівень виживання (%)	Зберігання при 23°С	Рівень виживання (%)
1	$(1.91\pm0.5)\times10^{11}$	$(3.83\pm0.12)\times10^{8}$	2	$(2.3\pm0.28)\times10^{4}$	0.01	$(1.91\pm0.11)\times10^{4}$	0.01
2	$(1.39\pm0.04)\times10^{11}$	$(2.33\pm0.07)\times10^{9}$	18	$(4.9\pm0.3)\times10^{8}$	21	$(2.79\pm0.72)\times10^{8}$	12
3	$(1.38\pm0.12)\times10^{11}$	$(2.5\pm0.6)\times10^{9}$	18	$(1.2\pm0.09)\times10^{9}$	48	$(3.75\pm0.82)\times10^{8}$	15
4	$(3.47\pm0.46)\times10^{11}$	$(5.9\pm0.9)\times10^{9}$	17	$(3.2\pm0.7)\times10^{9}$	54	$(9.44\pm0.08)\times10^{8}$	16
5	$(1.17\pm0.11)\times10^{11}$	$(6.8\pm0.14)\times10^{9}$	58	$(2.4\pm0.04)\times10^{9}$	35	$(6.12\pm0.18)\times10^{8}$	9
6	$(6.25\pm0.26)\times10^{11}$	$(3.5\pm0.31)\times10^{9}$	56	$(2.3\pm0.08)\times10^{9}$	65	$(7\pm0.08)\times10^{8}$	20
7	$(1.72\pm0.04)\times10^{10}$	$(1\pm0.14)\times10^{8}$	58	$(6.7\pm0.26)\times10^{8}$	67	$(2.4\pm0.08)\times10^{8}$	24
8	$(3.23\pm0.04)\times10^{10}$	$(2.33\pm0.07)\times10^{8}$	72	$(1.4\pm0.05)\times10^{9}$	60	$(8.36\pm0.31)\times10^{9}$	20
9	$(8.36\pm0.16)\times10^{11}$	$(6.02\pm0.25)\times10^{9}$	72	$(2.5\pm0.07)\times10^{9}$	68	$(1.98\pm0.09)\times10^{9}$	33
10	$(1.47\pm0.02)\times10^{11}$	$(1.09\pm0.3)\times10^{9}$	74	$(7.9\pm0.3)\times10^{9}$	72	$(3.81\pm0.11)\times10^{9}$	35

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

Після тримісячного зберігання ліофілізованих порошків бактерій були перераховані живі клітини у кожному захисному середовищі. Результати наведені в таблиці 2 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. Як загальний результат, 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 містять 6% знежиреного молока, 4% желатину та 8% сахарози. Тому цей варіант середовища є найбільш ефективним серед випробуваних кріопротекторних комбінацій [76].

Також із даних таблиць можна зробити висновок про те, що оптимальним співвідношенням біомаси бактерій до захисного середовища є

2:1. Про це свідчить більша кількість життєздатних клітин після процесу сушіння.

5.3.2. Обгрунтування підготовки вентиляційного повітря

Виробництво пробіотичного препарату «Лактобактерин» здійснюється у приміщеннях класів чистоти В, а подальший контроль готового препарату здійснюється у лабораторіях з класом чистоти приміщень С, в які подається очищене вентиляційне повітря, що має відповідати вимогам GMP до виробництва даного готового препарату.

Характеристику виробничих приміщень для виробництва та контролю якості пробіотиків наведено у табл. 5.8.

Таблиця 5.8

Характеристика виробничих приміщень [7]

Найменування приміщень	Клас чистоти, КУО/м^3 повітря	Максимально допустима кількість часточок в 1 м^3 повітря			
		Оснащений стан		Експлуатаційний стан	
		0,5 мкм	5,0 мкм	0,5мкм	5,0 мкм
Для підготовки інокуляту, виробничого біосинтезу, розливу, сушіння, подрібнення і фасування препарату	В (із зоною А), В не більше ніж	3500	0	350000	2000
Лабораторія для контролю готового препарату	С не більше ніж 100	350000	2000	3500000	20000
Для приготування і зберігання середовищ (поживного і захисного), «чистий» коридор	D не більше ніж 200	3500000	20000	Не нормується	Не нормується
Для маркування і пакування у групову тару, миття склянного посуду, підготовки допоміжних матеріалів	Не класифікуєтьс я	-	-	-	-

Повітря виробничих приміщень – потенційне джерело забруднення препаратів, тому його очищення є одним з ключових завдань підготовки виробництва. Під вентиляційним повітрям розуміють повітря, очищене від часток та мікроорганізмів у системі підготовки дво- або триступінчатої фільтрації, яке надходить до приміщень виробництва нестерильних лікарських засобів.

Системи вентиляції та кондиціювання повітря мають бути обладнані звуковбирними й віброгасячими пристроями, з метою зниження рівня шуму та вібрації до заданих меж, автоматичним регулюванням температури й вологості, блокуванням, сигналізацією.

Повітроводи слід періодично очищати та проводити їх дезінфекційну обробку для уникнення розвитку сторонньої мікрофлори. Повітроводи, фільтрувальні камери і їх конструкції мають бути виготовлені з матеріалу, стійкого до дезінфекційних розчинів з метою уникнення їх пошкодження.

Очищення припливного повітря має бути ступінчатим, з метою видалення частинок різного діаметру, що наявні у повітрі. Кількість рівнів очищення обумовлюється необхідною чистотою повітряного середовища приміщення.

З метою забору повітря з атмосфери та створення необхідного тиску для проходження усієї системи підготовки вентиляційного повітря і подолання опору кожної одиниці обладнання необхідним є використання вентиляторів.

Для попереднього охолодження та наступного нагрівання вентиляційного повітря до відповідної температури необхідним є використання теплообмінника-охолоджувача та теплообмінника-нагрівача. За допомогою них створюється комфортна температура в виробничих приміщеннях, яку слід підтримувати на рівні (21±2)^{o}C взимку і (23±2)^{o}C влітку.

З метою очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) необхідним є застосування фільтрів класу G – фільтрів грубого очищення.

З метою очищення повітря до ступеня Е = 95% необхідним є застосування фільтрів класу F – фільтрів тонкої очистки.

З метою очищення повітря до ступеня Е =99,5% необхідним є використання фільтрів класу Н - фільтри (*High Efficiency Particular Airfilters*) НЕРА.

Підготовка вентиляційного повітря для приміщень класів чистоти С здійснюється у системі двохступеневої фільтрації повітря, класу В у системі триступеневої фільтрації:

- для виробничих приміщень класу чистоти В:

1 рівень – не нижче класу G 4

2 рівень – не нижче класу F 7

3 рівень – не нижче класу Н 12

- для приміщень класу чистоти С:

1 рівень – не нижче класу G 3

2 рівень – не нижче класу F 6

На кожному рівні очищення слід передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтрації [43].

Необхідно передбачити контроль контамінації повітря, який здійснюється: для визначення мікробної котамінації за допомогою апарата Кротова, для визначення концентрації механічних частинок - за допомогою аерозольного лічильника частинок.

РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ.

Згідно з ТЕО (див. розділ 3) потреба в сухій біомасі пробіотичного штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, яка використовується для виробництва препарту «Лактобактерин» на рік складає $G_{нт}$ = 308 кг. Таку кількість препарату необхідно отримати за $T_{рд}$ = 270 днів. концентрація цільового продукту – $G_{загп}$ = 3 г/л. Найвищий рівень біосинтезу біомаси досягається за умов росту бактерій протягом 24 год на середовищі такого складу (г/л): дріжджовий екстракт – C_1 = 5,0; м'ясний екстракт – C_2 = 10,0; гідролізат казеїну – C_3 = 10,0; глюкоза – C_4 = 20,0; твін 80 – C_5 = 1,0; ацетат натрію – C_6 = 5,0; цитрат амонію – C_7 = 2,0; K_2HPO_4 – C_8 = 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – C_9 = 0,2; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – C_{10} = 0,05. Для подальших розрахунків приймемо наступні дані:

- час роботи ферментера $T_{цф}$ = 34 год (тривалість культивування – 24 год; тривалість підготовчих робіт – миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), підігрів та стерилізація (2 год), охолодження ферментера (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів культурою (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));
- сумарні втрати при виділені цільового продукту $E_{св}$ = 0,1;
- коефіцієнт запасу K_1=1,1;

6.1. Розрахунок кількості виробничих циклів

Кількість продукту за добу:

$$G_д = \frac{G_{нт}}{T_д} = \frac{308}{270} = 1{,}14 \ {}^{кг}/_{добу}$$

Кількість продукту за цикл:

$$G_{\text{ц}} = \frac{G_1 \cdot \text{Т}_{\text{цф}}}{24} = \frac{1{,}14 \cdot 34}{24} = 1{,}6 \ {}^{\text{кг}}/_{\text{цикл}}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл)

$$V_{\text{кр}} = \frac{\text{К}_1 \cdot G_{\text{ц}} \cdot \text{СР}_{\text{гп}}}{\text{Р}_{\text{кр}} \cdot (1 - \text{Е}_{\text{св}})} = \frac{1{,}1 \cdot 1{,}6 \cdot 0{,}95}{3 \cdot (1 - 0{,}1)} = 0{,}63 \text{ м}^3$$

Кількість циклів за рік:

$$K_{\text{ц}} = \frac{G_{\text{нт}}}{G_{\text{ц}}} = \frac{308}{1{,}6} = 192{,}5 \text{ циклів}$$

Приймаємо 193 цикли.

6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{\text{ф}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{0{,}63}{1 - 0{,}1} = 0{,}7 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{псф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{0{,}7}{1 + 0{,}1} = 0{,}64 \text{ м}^3$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{псф}} = 0{,}7 - 0{,}64 = 0{,}06 \text{ м}^3 = 60 \text{ л}$$

Коефіцієнт заповнення ферментера обрано $K_{\text{зф}}$ = 0,7, адже культивування здійснюється глибинним способом в анаеробних умовах, тому сильного піноутвореннння не спостерігається, тому його геометричний об'єм:

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\text{ф}}}{K_{\text{зф}}} = \frac{0{,}7}{0{,}7} = 1 \text{ м}^3$$

6.2.2. Кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість ПМ становить $X_{\text{ф}} = X_{\text{па}} = X_{\text{і}} = X_{\text{колб}}$ = 10 % від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з посівного апарата:

$$V_{\text{пмф}} = 60 \text{ л}$$

ПМ для посівного апарата з інокулятора:

$$V_{\text{пма}} = V_{\text{пмф}} \cdot X_{\text{і}} = 60 \cdot 0{,}1 = 6 \text{ л}$$

ПМ для інокулятора з качалочних колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{пма}} \cdot X_{\text{кол}} = 6 \times 0{,}1 = 0{,}6 \text{ л} = 600 \text{ мл}$$

Отже, маємо 3 ступеневу стадію отримання ПМ.

6.2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псф}}$ складають:

$G_{\text{заг}} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\sum} = 0{,}64 \times 55{,}25 = 35{,}36$ кг, в тому числі покомпонентно, кг:

Дріжджовий екстракт $G_1 = G_{\text{заг}}(C_1/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (5/55{,}25) = 3{,}2$

М'ясний екстракт $G_2 = G_{\text{заг}}(C_2/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (10/55{,}25) = 6{,}4$

Гідролізат казеїну $G_3 = G_{\text{заг}}(C_3/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (10/55{,}25) = 6{,}4$

Глюкоза $G_4 = G_{\text{заг}}(C_4/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (20/55{,}25) = 12{,}8$

Твін 80 $G_5 = G_{\text{заг}}(C_5/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (1/55{,}25) = 0{,}64$

Ацетат натрію $G_6 = G_{\text{заг}}(C_6/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (5/55{,}25) = 3{,}2$

Цитрат амонію $G_7 = G_{\text{заг}}(C_7/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (2/55{,}25) = 1{,}28$

K_2HPO_4 $G_8 = G_{\text{заг}}(C_8/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (2/55{,}25) = 1{,}28$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_9 = G_{\text{заг}}(C_9/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (0{,}2/55{,}25) = 0{,}128$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ $G_{10} = G_{\text{заг}}(C_{10}/C_{\sum}) = 35{,}36 \times (0{,}05/55{,}25) = 0{,}032$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера.

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{\text{кон}}$ = 0,1. Загальна

кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у ферментері, становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} K_{\text{кон}} = 640 \times 0{,}1 = 64 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псф}} - V_{\text{фк}} - G_{\text{заг}} = 640 - 64 - 35{,}36 \ = 540{,}6 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1кг.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, гідролізат казеїну, глюкоза та твін 80, композицію Б – ацетат натрію, цитрат амонію, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$.

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 88,6 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Дріжджовий екстракт $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_1/C_{\sum}) = 88{,}6 \times (5/55{,}25) = 8$

М'ясний екстракт $V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_2/C_{\sum}) = 88{,}6 \times (10/55{,}25) = 16$

Гідролізат казеїну $V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_3/C_{\sum}) = 88{,}6 \times (10/55{,}25) = 16$

Глюкоза $V_{4\text{в}} = V_{\text{в}}(C_4/C_{\sum}) = 88{,}6 \times (20/55{,}25) = 32$

Твін 80 $V_{5\text{в}} = V_{\text{в}}(C_5/C_{\sum}) = 88{,}6 \times (1/55{,}25) = 1{,}6$

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_{\text{в}} = 540{,}6 - 88{,}6 = 452 \text{ л}$$

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Ацетат натрію $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_6/C_{\sum}) = 452 \times (5/55{,}25) = 40{,}9$

Цитрат амонію $V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_7/C_{\sum}) = 452 \times (2/55{,}25) = 16{,}4$

K_2HPO_4 $V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_8/C_{\sum}) = 452 \times (2/55{,}25) = 16{,}4$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $V_{4\text{в}} = V_{\text{в}}(C_9/C_{\sum}) = 452 \times (0{,}2/55{,}25) = 1{,}6$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ $V_{5в} = V_в(C_{10}/C_\Sigma) = 452 \times (0{,}05/55{,}25) = 0{,}4$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А $V_{Ав} = 88{,}6$

Композиція Б $V_{Бв} = 452$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

Композиція А – $V_{1к} = V_к\,(V_{Ав}/V_в) = 64 \times (88{,}6/540{,}6) = 10{,}48$

Композиція Б – $V_{2к} = V_к(V_{Бв}/V_в) = 64 \times (452/540{,}6) = 53{,}5$

Формування композицій:

Таблиця 6.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 640 л середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Дріжджовий екстракт	5	3,2	А	118
М'ясний екстракт	10	6,4		
Гідролізат казеїну	10	6,4		
Глюкоза	20	12,8		
Твін 80	1	0,64		
Вода		88,6		
Конденсат		10,48		10,48
Ацетат натрію	5	3,2	Б	458
Цитрат амонію	2	1,28		
K_2HPO_4	2	1,28		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,128		
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05	0,032		
Вода		452		
Конденсат		53,5		53,5
Разом:		**640**		**640**

6.2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{па}}} = \frac{60}{1 - 0{,}1} = 67\text{л}$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{67}{1 + 0{,}1} = 61 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарата:

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 67 - 61 = 6 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарата $K_{\text{зпа}}$ = 0,7 його приблизний геометричний об’єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{67}{0{,}7} = 96 \text{ л}$$

Обираємо серед стандартних посівних апаратів найближчий за об’ємом – 100 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$\text{К}_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{67}{100} = 0{,}67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах $K_{зап}$ = 0,6…0,75.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об’єм поживного середовища $V_{\text{пспа}}$ складають:

$G_{\text{заг}} = V_{\text{пспа}} C_{\sum} = 0{,}061 \times 55{,}25 = 3{,}37$ кг, в тому числі покомпонентно, кг:

Дріжджовий екстракт $G_1 = G_{\text{заг}}(C_1/C_{\sum}) = 3{,}37 \times (5/55{,}25) = 0{,}305$

М’ясний екстракт $G_2 = G_{\text{заг}}(C_2/C_{\sum}) = 3{,}37 \times (10/55{,}25) = 0{,}61$

Гідролізат казеїну $G_3 = G_{\text{заг}}(C_3/C_{\sum}) = 3{,}37 \times (10/55{,}25) = 0{,}61$

Глюкоза $G_4 = G_{\text{заг}}(C_4/C_{\sum}) = 3{,}37 \times (20/55{,}25) = 1{,}22$

Твін 80 $G_5 = G_{\text{заг}}(C_5/C_{\sum}) = 3{,}37 \times (1/55{,}25) = 0{,}061$

Ацетат натрію $G_6 = G_{заг}(C_6/C_\Sigma) = 3{,}37 \times (5/55{,}25) = 0{,}305$

Цитрат амонію $G_7 = G_{заг}(C_7/C_\Sigma) = 3{,}37 \times (2/55{,}25) = 0{,}122$

K_2HPO_4 $G_8 = G_{заг}(C_8/C_\Sigma) = 3{,}37 \times (2/55{,}25) = 0{,}122$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_9 = G_{заг}(C_9/C_\Sigma) = 3{,}37 \times (0{,}2/55{,}25) = 0{,}012$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ $G_{10} = G_{заг}(C_{10}/C_\Sigma) = 3{,}37 \times (0{,}05/55{,}25) = 0{,}003$

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в окремих реакторах гострою парою, $K_{кон}$ = 0,1. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у посівному апараті, становитиме:

$$V_{кпа} = V_{пспа} K_{кон} = 61 \times 0{,}1 = 6{,}1 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища:

$$V_в = V_{пспа} - G_{заг} - V_{кпа} = 61 - 3{,}37 - 6{,}1 = 51{,}53 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1кг.

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, гідролізат казеїну, глюкоза та твін 80, композицію Б – ацетат натрію, цитрат амонію, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$.

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 19 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Дріжджовий екстракт $V_{1в} = V_в(C_1/C_\Sigma) = 19 \times (5/55{,}25) = 1{,}72$

М'ясний екстракт $V_{2в} = V_в(C_2/C_\Sigma) = 19 \times (10/55{,}25) = 3{,}44$

Гідролізат казеїну $V_{3в} = V_в(C_3/C_\Sigma) = 19 \times (10/55{,}25) = 3{,}44$

Глюкоза $V_{4в} = V_в(C_4/C_\Sigma) = 19 \times (20/55{,}25) = 6{,}87$

Твін 80 $V_{5в} = V_в(C_5/C_\Sigma) = 19 \times (1/55{,}25) = 0{,}34$

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить, л:

$$V_{\text{в}} = 51{,}53 - 19 = 32{,}53 \text{ л}$$

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, л:

Ацетат натрію $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_6/C_{\sum}) = 32{,}53 \times (5/55{,}25) = 2{,}94$

Цитрат амонію $V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_7/C_{\sum}) = 32{,}53 \times (2/55{,}25) = 1{,}17$

K_2HPO_4 $V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_8/C_{\sum}) = 32{,}53 \times (2/55{,}25) = 1{,}17$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $V_{4\text{в}} = V_{\text{в}}(C_9/C_{\sum}) = 32{,}53 \times (0{,}2/55{,}25) = 0{,}11$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ $V_{5\text{в}} = V_{\text{в}}(C_{10}/C_{\sum}) = 32{,}53 \times (0{,}05/55{,}25) = 0{,}03$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А $V_{\text{Ав}} = 19$

Композиція Б $V_{\text{Бв}} = 32{,}53$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

Композиція А – $V_{1\text{к}} = V_{\text{к}}\,(V_{\text{Ав}}/V_{\text{в}}) = 6{,}1 \times (19/51{,}53) = 2{,}25$

Композиція Б – $V_{2\text{к}} = V_{\text{к}}(V_{\text{Бв}}/V_{\text{в}}) = 6{,}1 \times (32{,}53/51{,}53) = 3{,}85$

Таблиця 6.2

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 61 л середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Дріжджовий екстракт	5	0,3	А	21,8
М'ясний екстракт	10	0,61		
Гідролізат казеїну	10	0,61		
Глюкоза	20	1,22		
Твін 80	1	0,061		
Вода		19		
Конденсат		2,25		2,25

Продовження таблиці 6.2

Ацетат натрію	5	0,3	Б	33,1
Цитрат амонію	2	0,122		
K_2HPO_4	2	0,122		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,012		
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05	0,003		
Вода		32,53		
Конденсат		3,85		3,85
Разом:		**61**		**61**

6.2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{і}} = \frac{V_{\text{пмі}}}{1 - E_{\text{і}}} = \frac{6}{1 - 0{,}1} = 6{,}7\text{л}$$

Кількість поживного середовища у інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{псі}} = \frac{V_{\text{і}}}{1 + X_{\text{і}}} = \frac{67}{1 + 0{,}1} = 6{,}1 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора:

$$V_{\text{пмі}} = V_{\text{і}} - V_{\text{псі}} = 6{,}7 - 6{,}1 = 0{,}6 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення інокулятора $K_{\text{зі}}$ = 0,7 його приблизний геометричний об’єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{і}}}{K_{\text{зі}}} = \frac{6{,}7}{0{,}7} = 9{,}6 \text{ л}$$

Обираємо серед стандартних інокуляторів найближчий за об’ємом – 10 л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$\text{К}_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{і}}}{V_{\text{гі}}} = \frac{6{,}7}{10} = 0{,}67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах $K_{зап}$ = 0,6…0,75.

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псі}}$ складають:

$G_{\text{заг}} = V_{\text{псі}} C_{\sum} = 6{,}1 \times 55{,}25 = 337$ г, в тому числі покомпонентно, г:

Дріжджовий екстракт $G_1 = G_{\text{заг}}(C_1/C_{\sum}) = 337 \times (5/55{,}25) = 30{,}5$

М'ясний екстракт $G_2 = G_{\text{заг}}(C_2/C_{\sum}) = 337 \times (10/95{,}25) = 61$

Гідролізат казеїну $G_3 = G_{\text{заг}}(C_3/C_{\sum}) = 337 \times (10/95{,}25) = 61$

Глюкоза $G_4 = G_{\text{заг}}(C_4/C_{\sum}) = 337 \times (20/95{,}25) = 122$

Твін 80 $G_5 = G_{\text{заг}}(C_5/C_{\sum}) = 337 \times (1/95{,}25) = 6{,}1$

Ацетат натрію $G_6 = G_{\text{заг}}(C_6/C_{\sum}) = 337 \times (5/95{,}25) = 30{,}5$

Цитрат амонію $G_7 = G_{\text{заг}}(C_7/C_{\sum}) = 337 \times (2/95{,}25) = 12{,}2$

K_2HPO_4 $G_8 = G_{\text{заг}}(C_8/C_{\sum}) = 337 \times (2/95{,}25) = 12{,}2$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_9 = G_{\text{заг}}(C_9/C_{\sum}) = 337 \times (0{,}2/95{,}25) = 1{,}2$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ $G_{10} = G_{\text{заг}}(C_{10}/C_{\sum}) = 337 \times (0{,}05/95{,}25) = 0{,}3$

Розраховуємо кількість води для розчинення по композиціях. Композицію А складають дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, гідролізат казеїну, глюкоза та твін 80 (стерилізується в колбах), композицію Б – ацетат натрію, цитрат амонію, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ стерилізується в інокуляторі).

Розраховуємо об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища в інокуляторі гострою парою, $K_{\text{кон}} = 0{,}1$. Загальна кількість конденсату, що утворюється при стерилізації ПС у інокуляторі, з урахуванням того, що на композицію А взято 1,5 л води, становитиме:

$$V_{\text{кі}} = V_{\text{псі}} K_{\text{кон}} = (6{,}1 - 1{,}5) \times 0{,}1 = 0{,}46 \text{ л}$$

Загальна кількість води, яка необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища композиції Б:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пспа}} - G_{\text{заг}} - V_{\text{кі}} = 4{,}6 - 0{,}337 - 0{,}46 = 3{,}8 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1кг.

Загальна кількість води для розчинення композиції А становить 1,5 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Дріжджовий екстракт $V_{1в} = V_в(C_1/C_\sum) = 1500 \times (5/55{,}25) = 136$

М'ясний екстракт $V_{2в} = V_в(C_2/C_\sum) = 1500 \times (10/55{,}25) = 272$

Гідролізат казеїну $V_{3в} = V_в(C_3/C_\sum) = 1500 \times (10/55{,}25) = 272$

Глюкоза $V_{4в} = V_в(C_4/C_\sum) = 1500 \times (20/55{,}25) = 543$

Твін 80 $V_{5в} = V_в(C_5/C_\Sigma) = 1500 \times (1/55{,}25) = 27$

Загальна кількість води для розчинення композиції Б становить 3,8 л.

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Ацетат натрію $V_{1в} = V_в(C_6/C_\sum) = 3800 \times (5/55{,}25) = 344$

Цитрат амонію $V_{2в} = V_в(C_7/C_\sum) = 3800 \times (2/55{,}25) = 138$

K_2HPO_4 $V_{3в} = V_в(C_8/C_\sum) = 3800 \times (2/55{,}25) = 138$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $V_{4в} = V_в(C_9/C_\sum) = 3800 \times (0{,}2/55{,}25) = 14$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ $V_{5в} = V_в(C_{10}/C_\sum) = 3800 \times (0{,}05/55{,}25) = 3$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

Композиція А $V_{Ав} = 1{,}5$

Композиція Б $V_{Бв} = 3{,}8$

Таблиця 6.3

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у інокуляторі

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 6100 мл середовища, г (мл)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, мл**
Дріжджовий екстракт	5	30,5	А	1780
М'ясний екстракт	10	61		
Гідролізат казеїну	10	61		
Глюкоза	20	122		
Твін 80	1	6,1		
Вода		1500		
Ацетат натрію	5	30,5	Б	3860
Цитрат амонію	2	12,2		
K_2HPO_4	2	12,2		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	1,2		
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05	0,3		
Вода		3800		
Конденсат		460		460
Разом:		**6100**		**6100**

6.2.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{кол}} = \frac{V_{\text{пмі}}}{1 - E_{\text{кол}}} = \frac{0,6}{1 - 0,01} = 0,6 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у колбах становитиме:

$$V_{\text{пск}} = \frac{V_{\text{кол}}}{1 + X_{\text{кол}}} = \frac{0,6}{1 + 0,1} = 0,54 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 0{,}6 - 0{,}54 = 0{,}06 \text{ л} = 60 \text{ мл}$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пск}}$ складають:

$G_{\text{заг}} = V_{\text{пск}} C_{\sum} = 0{,}54 \times 55{,}25 = 29{,}8$ г, в тому числі покомпонентно, г:

Дріжджовий екстракт $G_1 = G_{\text{заг}}(C_1/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (5/55{,}25) = 2{,}7$

М'ясний екстракт $G_2 = G_{\text{заг}}(C_2/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (10/55{,}25) = 5{,}4$

Гідролізат казеїну $G_3 = G_{\text{заг}}(C_3/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (10/55{,}25) = 5{,}4$

Глюкоза $G_4 = G_{\text{заг}}(C_4/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (20/55{,}25) = 10{,}8$

Твін 80 $G_5 = G_{\text{заг}}(C_5/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (1/55{,}25) = 0{,}5$

Ацетат натрію $G_6 = G_{\text{заг}}(C_6/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (5/55{,}25) = 2{,}7$

Цитрат амонію $G_7 = G_{\text{заг}}(C_7/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (2/55{,}25) = 1{,}1$

K_2HPO_4 $G_8 = G_{\text{заг}}(C_8/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (2/55{,}25) = 1$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $G_9 = G_{\text{заг}}(C_9/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (0{,}2/55{,}25) = 0{,}1$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ $G_{10} = G_{\text{заг}}(C_{10}/C_{\sum}) = 29{,}8 \times (0{,}05/55{,}25) = 0{,}03$

Враховуючи малу кількість компонентів, їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві, при цьому конденсат не утворюється.

Загальна кількість води, необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища, становитиме:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{кол}} - G_{\text{заг}} = 540 - 29{,}8 = 510 \text{ мл}$$

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

Дріжджовий екстракт $V_{1\text{в}} = V_{\text{в}}(C_1/C_{\sum}) = 510 \times (5/55{,}25) = 46$

М'ясний екстракт $V_{2\text{в}} = V_{\text{в}}(C_2/C_{\sum}) = 510 \times (10/55{,}25) = 92$

Гідролізат казеїну $V_{3\text{в}} = V_{\text{в}}(C_3/C_{\sum}) = 510 \times (10/55{,}25) = 92$

Глюкоза $V_{4в} = V_в(C_4/C_\sum) = 510 \times (20/55{,}25) = 185$

Твін 80 $V_{5в} = V_в(C_5/C_\sum) = 510 \times (1/55{,}25) = 9$

Ацетат натрію $V_{6в} = V_в(C_6/C_\sum) = 510 \times (5/55{,}25) = 46$

Цитрат амонію $V_{7в} = V_в(C_7/C_\sum) = 510 \times (2/55{,}25) = 19$

K_2HPO_4 $V_{8в} = V_в(C_8/C_\sum) = 510 \times (2/55{,}25) = 19$

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $V_{9в} = V_в(C_9/C_\sum) = 510 \times (0{,}2/55{,}25) = 2$

$MnSO_4 \cdot H_2O$ – $V_{10в} = V_в(C_{10}/C_\sum) = 510 \times (0{,}05/55{,}25) = 1$

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

Композиція А $V_{Ав} = 46 + 92 + 92 + 185 + 9 = 424$

Композиція Б $V_{Бв} = 46 + 19 + 19 = 84$

Композиція В $V_{Вв} = 2 + 1 = 3$

Таблиця 6.4

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 540 мл середовища, г (мл)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, мл**
Дріжджовий екстракт	5	2,7	А	448
М'ясний екстракт	10	5,4		
Гідролізат казеїну	10	5,4		
Глюкоза	20	10,8		
Твін 80	1	0,5		
Вода		424		
Ацетат натрію	5	2,7	Б	89
Цитрат амонію	2	1,1		
K_2HPO_4	2	1		

Продовження таблиці 6.4

Вода		84		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,1	В	3
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05	0,03		
Вода		3		
Разом:		**540**		**540**

6.3. Розрахунок напівпродуктів та баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу

Кількість абсолютно сухих речовин в поживному середовищі для виробничого біосинтезу – $G_ф = V_{псф} \times C\Sigma_ф = 0,64 \times 55,25 = 35,36$ кг

Кількість абсолютно сухих речовин в посівному матеріалі з врахуваням втрат при вирощуванні в інокуляторі (E_i=0,1):

$$G_i = V_{псі} \times C\Sigma_ф = 0,061 \times 55,25 = 3,37 \text{ кг}$$

$$G_{івт} = G_i \times (1-E_i) = 3,03 \text{ кг}$$

Загальна кількість абсолютно сухих речовин $G_{срф}$ у середовищі для виробничого біосинтезу становить

$$G_{срф} = G_ф + G_{івт} = 35,36+3,03 = 38,4 \text{ кг}$$

Кількість втрат абсолютно сухих речовин $G_{втб}$ у культуральній рідині в процесі виробничого біосинтезу з врахуванням коефіцієнта втрат $E_{бс}$ = 0,35 (частка):

$$G_{втб} = G_{срф} \times E_{бс} = 38,4 \cdot 0,35 = 13,44 \text{ кг}$$

Кількість абсолютно сухих речовин в культуральній рідині, що йде на подальшу переробку, становить:

$$G_{саркр} = G_{срф} - G_{втб} = 38,4 - 13,44 = 25 \text{ кг}$$

Кількість культуральної рідини після виробничого біосинтезу, кг:

$G_{кр} = V_{кр} \cdot \rho_{кр} = 0,63 \cdot 1050 = 661,5$ кг, де $\rho_{кр}$ – середня густина культуральної рідини ($\rho_{кр}$ = (1020…1050 кг/м^3).

Визначаємо кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) в культуральній рідині:

$$G_{асб} = V_{кр} \cdot X_{кр} = 630 \cdot 3 = 1890 \text{ г}$$

Кількість абсолютно сухих баластних речовин в культуральній рідині становить

$$G_{брв} = G_{сркр} - G_{асб} = 25 – 1,89 = 23,11 \text{ кг}$$

Кількість води, що міститься в культуральній рідині, складе

$$G_{води} = G_{кр} - G_{асб} - G_{брв} = 661,5 – 1,89 – 23,11 = 636,5 \text{ кг}$$

6.4. Відділення біомаси сепаруванням

Об'єм суспензії культуральної рідини, що йде на подальшу переробку складає $V_{кр} = 630$ л.

Біомаса містить вологи від 65…85% вологи, приймемо $W_{кл}$=0,70 (частка), тоді кількість вологої біомаси в культуральній рідині становитиме:

$$G_{вб} = G_{асб}/(1-W_{кл}) = 1890/(1-0,70) = 6300 \text{ г}$$

Вологий осад містить 10…15 % міжклітинної вологи, приймаємо $W_{мв}$= 0,10 (частка), тоді загальна кількість вологого осаду, що видаляється з культуральної рідини $V_{кр}$ складе:

$$G_{осв} = G_{вб}/(1-W_{мв}) = 6300/(1-0,10) = 7 \text{ кг}$$

Маса вологого осаду, який одержують під час сепарування 1 л суспензії:

$$m_o = G_{осв} /V_{кр} = 7000/630 = 11 \text{ г/л}$$

Об'єм волого осаду в суспензії становить:

$$V_{осв} = G_{осв} \cdot 1000/\rho_{ос} = 7 \cdot 1000/1050 = 6,6 \text{ л}$$

Втрати суспензії при сепаруванні складають:

$$V_{втф} = V_{кр} \cdot 1000 \cdot E_{фт} = 630 \cdot 1000 \cdot 0,03 = 18,9 \text{ л},$$

де $E_{фт} = 0,03$ (коефіцієнт втрат при сепаруванні, частка)

Об'єм отриманого супернатанту з урахуванням втрат при центрифугуванні:

$$V_{фгм} = V_{кр} – V_{осв} – V_{втф} = 630 – 6,6 – 18,9 = 604,5 \text{ л}$$

6.5. Сублімаційне сушіння

Маса осаду, що йде на сушіння, складає $G_{осв} = 6.93$ кг

Маса висушеного препарату з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{сш} = 0,03$ (частка) сухої, що виходить з сушарки, при стандартному вмісті сухих речовин в готовому продукті $СР_{гп} = (1-W_в) = 0,95$ (частка):

$$G_{сш} = G_{асб} \cdot (1-E_{сш})/СР_{гп} = 1890(1-0,03)/0,95 = 1929,8 \text{ г}$$

Маса води, що підлягає видаленню під час процесу сублімаційного сушіння:

$$W_{сш} = G_{осв} - G_{сш} = 6.93-1.93 = 5,07 \text{ кг}$$

6.6. Просіювання препарату

Маса препарату з врахуванням коефіцієнта втрат при просіюванні $E_{пр} = 0,01$ (частка):

$$G_{пр} = G_{сш} \cdot (1 – E_{пр}) = 1873 \cdot (1 – 0,01) = 1854 \text{ г}$$

6.7. Розрахунок стадії фасування

Препарат розфасовують в саше по 500 мг, а потім в гофровані коробки. Коефіцієнт втрат при фасуванні $E_{уп} = 0,03$ (частка).

Кількість упакованого препарату:

$$G_{уп} = G_{пр} \cdot (1 – E_{уп}) = 1854 \cdot (1 – 0,03) = 1798 \text{ г}$$

$$N_{пк} = G_{уп}/N_п = 1798/0,500 = 3596 \text{ пакетів-саше}$$

Механічні втрати готового препарату становлять:

$$G_{втм} = G_{пр} – G_{уп} = 1854 – 1798 = 56 \text{ г}$$

6.8. Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 6.5

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
1	*2*	*3*	*4*	*5*
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (г, мл)			
1.1	Дріжджовий екстракт	2,7	Нестерильне ПС	540

1.2	М’ясний екстракт	5,4		
1.3	Гідролізат казеїну	5,4		
1.4	Глюкоза	10,8		
1.5	Твін 80	0,5		
1.6	Ацетат натрію	2,7		
1.7	Цитрат амонію	1,1		
1.8	K_2HPO_4	1		
1.9	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1		
1.10	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,03		
1.11	Вода	511		
	Всього:	**540**	**Всього:**	**540**
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1	Нестерильне ПС	540	Стерильне ПС	540
	Всього:	**540**	**Всього:**	**540**
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)			
3.1	Стерильне ПС	540	Посівний матеріал	600
3.2	Посівний матеріал з пробірок	60		
	Всього:	**600**	**Всього:**	**600**
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (г, мл)			
4.1	Дріжджовий екстракт	30,5	Нестерильне ПС	5641
4.2	М’ясний екстракт	61		
4.3	Гідролізат казеїну	61		
4.4	Глюкоза	122		
4.5	Твін 80	6,1		
4.6	Ацетат натрію	30,5		
4.7	Цитрат амонію	12,2		
4.8	K_2HPO_4	12,2		
4.9	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,2		
4.10	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,3		
4.11	Вода	5300		
	Всього:	**5641**	**Всього:**	**5641**

5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩАДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
5.1	Нестерильне ПС	5,64	Стерильне ПС	6,1
5.2	Конденсат	0,46	(втрат немає)	0,0
	Всього:	**6,1**	**Всього:**	**6,1**
6	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ (л)			

Продовження таблиці 6.5

6.1	Стерильне ПС	6,1	Посівний матеріал	6,03
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	0,6		
6.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	0,67
	Всього:	**6,7**	**Всього:**	**6,7**
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТА (кг, л)			
7.1	Дріжджовий екстракт	0,3	Нестерильне ПС	54,9
7.2	М’ясний екстракт	0,61		
7.3	Гідролізат казеїну	0,61		
7.4	Глюкоза	1,22		
7.5	Твін 80	0,061		
7.6	Ацетат натрію	0,3		
7.7	Цитрат амонію	0,122		
7.8	K_2HPO_4	0,122		
7.9	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,012		
7.10	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,003		
7.11	Вода	51,53		
	Всього:	**54,9**	**Всього:**	**54,9**
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩАДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТА (л)			
8.1	Нестерильне ПС	54,9	Стерильне ПС	61
8.2	Конденсат	6,1	(втрат немає)	0,0
	Всього:	**61**	**Всього:**	**61**
9	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ (л)			
9.1	Стерильне ПС	61	Посівний матеріал	60,3
9.2	Посівний матеріал з інокулятора	6		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	6,7
	Всього:	**67**	**Всього:**	**67**
10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (кг, л)			
10.1	Дріжджовий екстракт	3,2	Нестерильне ПС	576
10.2	М’ясний екстракт	6,4		
10.3	Гідролізат казеїну	6,4		
10.4	Глюкоза	12,8		
10.5	Твін 80	0,64		
10.6	Ацетат натрію	3,2		
10.7	Цитрат амонію	1,28		
10.8	K_2HPO_4	1,28		

Продовження таблиці 6.5

10.9	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,128		
10.10	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,032		
10.11	Вода	540,6		
	Всього:	**576**	**Всього:**	**576**
11.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (л)			
11.1	Нестерильне ПС	576	Стерильне ПС	640
11.2	Конденсат	64	(втрат немає)	0,0
	Всього:	**640**	**Всього:**	**640**
12.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ (л)			
12.1	Стерильне поживне середовище	640	Культуральна рідина	630
12.2	Посівний матеріал з посівного апарата	60		
12.4	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	70
	Всього:	**700**	**Всього:**	**700**
13.	СЕПАРУВАННЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ			
13.1	КР на центрифугування, л	**630**	Вологий осад	6,93
			Супернатант	604,5
	Втрати (частка)	0,03	Втрати	18,9
	Всього:	**630**	Всього:	**630**
14.	СУШІННЯ ОСАДУ			
14.1	Волога біомаса, г	**6930**	Суха біомаса, г	1873
			Видалена волога, г	5000
	Втрати (частка)	0,03	Втрати, г	57
	Всього:	**6930**	Всього:	**6930**
15.	ПРОСІЮВАННЯ БІОМАСИ			
15.1	Суха біомаса, г	**1873**	Просіяна біомаса	1854
	Втрати (частка)	0,01	Втрати (частка)	19
	Всього:	**1873**	Всього:	**1873**
16.	ФАСУВАННЯ, УПАКУВАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ			
16.1.	Просіяна біомаса, г	**1854**	Готовий продукт	1798
	Втрати (частка)	0,03	Втрати (частка)	56
	Всього:	**1854**	Всього:	**1854**

Оскільки кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (630 л) співпадає із кількістю культуральної рідини, визначеної відповідно у п. 6.1 розрахунку партій продукту (630 л), вважаємо, що матеріальний баланс зроблено вірно.

Похибка продуктового розрахунку стадій виділення і очищення складає:

$\Delta = (G_{уп} - G_{цк}) \cdot 100/G_{уп} = (1798 – 1600) \cdot 100/1798 = 11$ %, що знаходиться в межах заданої точності ± 10 %. Робимо висновок, що продуктовий розрахунок зроблено вірно.

6.9. Розрахунок та підбір ферментаційної та ємнісної апаратури

6.9.1. Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

6.9.1.1. Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $К_з = 0{,}7$:

$$V_{гф} = \frac{V_ф}{K_{зап}} = \frac{0{,}7}{0{,}7} = 1 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{нф} = 1$ м^3.

Кількість виробничих ферментерів при заданому $К_з$:

$$N_ф = \frac{V_{гф}}{V_{нф}} = \frac{1}{1} = 1$$

Уточнення коефіцієнту заповнення не потребується. Приймаємо до установки ферментерів – 1 + 1 запасний.

6.9.1.2. Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $К_з = 0{,}7$:

$$V_{гпа} = \frac{V_{па}}{K_{зап}} = \frac{67}{0{,}7} = 96 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{нпа} = 100$ л.

Кількість посівних апаратів при заданому $К_з$:

$$N_{\text{па}} = \frac{V_{\text{гпа}}}{V_{\text{нпа}}} = \frac{96}{100} = 0{,}96$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення посівного апарату:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{нпа}} N_{\text{па}}} = \frac{67}{100 \times 1} = 0{,}67$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,65 – 0,85), приймаємо до установки посівних апаратів – 1 + 1 запасний.

6.9.1.3. Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $К_з$ = 0,7:

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{і}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{6{,}7}{0{,}7} = 9{,}6 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{\text{ні}}$ = 10 л.

Кількість інокуляторів при заданому $К_з$:

$$N_{\text{і}} = \frac{V_{\text{гі}}}{V_{\text{ні}}} = \frac{9{,}6}{10} = 0{,}96$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення інокулятора:

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{і}}}{V_{\text{ні}} N_{\text{і}}} = \frac{6{,}7}{10 \times 1} = 0{,}67$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,6– 0,85), приймаємо до установки інокуляторів – 1 + 1 запасний.

6.9.1.4. Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $К_{колб}$ = 0,7:

$$V_{\text{гколб}} = \frac{V_{\text{колб}}}{K_{\text{зколб}}} = \frac{0{,}6}{0{,}7} = 0{,}86 \text{ л}$$

Об'єм 1 качалочної колби $V_{\text{нколб}}$ = 0,5 л.

Кількість качалочних колб при заданому коефіцієнті заповнення $К_{колб}$ = 0,7:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{гколб}}}{V_{\text{нколб}}} = \frac{0{,}86}{0{,}5} = 1{,}7 \text{ шт.}$$

Приймаємо 2 колби.

6.9.2. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища

6.9.2.1. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1 м³

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{\text{б}}$ = 0,8:

$$V_{\text{Аг}} = \frac{V_{\text{А}}}{K_{\text{зб}}} = \frac{128}{0{,}8} = 160 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{\text{нр}}$ = 160 л. Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = \frac{V_{\text{Аг}}}{V_{\text{нр}}} = \frac{160}{160} = 1 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зр}} = \frac{V_{\text{А}}}{V_{\text{нр}} N_{\text{Ар}}} = \frac{128}{160 \times 1} = 0{,}8$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

6.9.2.2. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А.

Приблизний геометричний об’єм реактора-змішувача при заданому $K_б$ = 0,8:

$$V_{Аг} = \frac{V_А}{K_{зб}} = \frac{24,2}{0,8} = 30,2 \text{ л}$$

Вибираємо з найближчий за номінальним об’ємом реактор: $V_{нр}$ = 30 л. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_{Ар} = \frac{V_{Аг}}{V_{нр}} = \frac{30,2}{30} = 1 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = \frac{V_А}{V_{нр}N_{Ар}} = \frac{24,2}{30 \times 1} = 0,81$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

6.10. Розрахунок сепаратора

Вихідні дані для розрахунку сепаратора МВРХ 810Н:

Об'єм суспензії, що йде на центрифугування, $V_{сус} = V_{кр}$ = 630 л = 0,63 м^3.

Еквівалентна поверхня, Σ = 5000 м^2 (відстань між тарілками δ = 0,8 мм).

Час сепарування, τ_c = 45 хв.

Динамічна в'язкість суспензії, $\mu_{сус}$ = 1,5·10^{-3} Па·с

Різниця густин осаду та фугату, Δρ = 180 кг/м^3.

Діаметр клітин, $d_{кл}$ = 1,2 мкм.

Прийняти коефіцієнт правлення, β = 0,45.

1. Продуктивність сепаратора за цією суспензією:

$V_п = \beta\Sigma V_g = 0.45 \cdot 5000 \cdot 2 \cdot 180 \cdot (1.2/2 \cdot 10^{-6})^2 \cdot 9.81/9 \cdot 1.5 \cdot 10^{-3} = 2.119 \cdot 10^{-4}$ м^3/год.

2. Потрібна продуктивність становить: 0,63/0,75 = 0,84 м^3/год = 0,000233 м^3/с.

3. Потрібно встановити 0,0002119/0,000233 = 0,9 (1) сепаратор.

6.11. Розрахунок реактора для змішування біомаси із захисним середовищем

Підбираємо геометричний об'єм реактора для змішування біомаси із захисним середовищем. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,6:

$$V_{крг} = V_{кр}/К_{зб} = 2,8/0,6 = 4,6 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр}$ = 5 л.

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{крг}/V_{нр} = 4,6/5 = 0,92$ – приймаємо до установки 1 реактор

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$К_{зр} = V_{кр}/(V_{нр}\times N_р) = 2,8/(5\times 1) = 0,56$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,5 – 0,75), приймаємо до установки кількість збірників для зберігання культуральної рідини 1 + 1 запасний (2 шт.).

6.12. Розрахунок сублімаційної сушарки

Маса матеріалу, що підлягає сушінню за технологічний цикл, який триває 34 години, $G_с$= 7 кг. За цей період одержують 1929,8 г висушеного продукту і 5,07 кг водяного конденсату. Температури сублімації та конденсації відповідно -27 та -55°С, коефіцієнт масопередачі $\beta = 5\cdot 10^{-5}$ с/м. Початкова температура суспензії дорівнює 20°С, питома теплоємність становить 3,1 кДж/(кгК).

І. Визначення основних розмірів сублімаційної камери

Довільно приймемо, що кількість циклів сублімації за повний технологічний цикл виробництва дорівнює 1.

1. Цикл сублімації триває 34/1 = 34 годин.

2. За один цикл потрібно переробити 7/1 = 7 кг біомаси, яка при густині вихідного продукту 1200 кг/м^3 буде займати об'єм 7/1200 = 0,0058

$м^3$ при цьому видалиться 5,07/1 = 5,07 кг водяного коденсату.

3. Біомасу розливають на горизонтальні піддони шаром близько 6 мм. Отже, поверхня піддонів повинна бути 0,0058/0,006 = 0,97 $м^2$.

Обираємо сушарку з піддоном необхідного розміру (площа одного піддону 0,5 $м^2$) і приймаємо кількість піддонів n = 2.

II. Визначення часу заморожування і охолодження замороженої суспензії

Тепло, яке віднімається від суспензії, при охолодженні від 20 °С до 0 °С (від Т1 до Т2): Q = Gcp (T1 - T2) = 7 · 3,1(20 - 0) = 434 кДж

Крім охолодження суспензії, потрібно охолодити камеру, виготовлену зі сталі, яка має масу 50 кг. Для її охолодження потрібно витратити:

$$50 \cdot 0{,}45(20 - 0) = 450 \text{ кДж}.$$

Отже, загальна витрата тепла становить 450 + 434 = 884 кДж.

Приймемо, що для охолодження суспензії використовують холодильну машину, яка охолоджує розсіл до температури t_1 = -27 °С, а під час охолодження згідно з технічними даними температура розсолу на вході в машину не може бути вище -5 °С (приймемо t_2 = -10 °С).

Орієнтовно розрахуємо коефіцієнт теплопередачі *К* від холодоносія до суспензії. Без розрахунків приймемо, що коефіцієнт тепловіддачі від холодоносія до стінки плити становить α = 700 Вт/($м^2$×К), а теплопередачами крізь стінки плити і піддона знехтуємо. Забруднення на внутрішніх стінках плити від розсолу не відкладаються, а вплив забруднень з боку суспензії незначний, оскільки кювети регулярно очищують під час розвантаження. У той же час на теплопередачу буде суттєво впливати повітряний зазор між плитою та кюветою, який обов'язково утворюється, оскільки конструкцією субліматора в період завантаження та розвантаження апарата передбачене ковзання кювети по плиті по типу шухляди письмового стола. Прийнято, що цей зазор становить 0,5 мм. Коефіцієнт теплопровідності повітря 0,036 Вт/(м· К). Тоді коефіцієнт теплопередачі буде становити:

$$К = 1/(1/700+0,0005/0,036+0,005/0,62) = 42,8 \text{ Вт/(м}^2\cdot\text{К)}$$

Процес охолодження до 0 °С – нестаціонарний. Отже, середню різницю температур потрібно розраховувати за формулою:

$$\Delta t_{\text{сер.ох}} = \frac{\mathrm{T}_1 - \mathrm{T}_2}{ln\frac{T_1 - t_1}{T_2 - t_2}} \cdot \frac{A-1}{A\ lnA}, \text{де } A = \frac{T - t_1}{T - t_2} = \frac{0+27}{0+10} = 2.7$$

Наприкінці охолодження $T = T_2 = 0$ °С

$$\Delta t_{\text{сер.ох}} = \frac{20-0}{ln\frac{20+27}{0+27}} \cdot \frac{2,7-1}{2,7\ ln2,7} = 22,7\ ^{\text{o}}\text{C}$$

Отже, час охолодження суспензії до 0 °С буде становити:

$$\tau = 884 \cdot 10^3/(42,8 \cdot 43,3 \cdot 22,7) = 21 \text{ с} = 0,00583 \text{ год.}$$

Визначимо час заморожування рідини.

Тепло, яке потрібно зняти в процесі заморожування:

$$Q_2 = Gr_{\text{т}} = 7\cdot 332,8 = 2329,6 \text{ кДж,}$$

де $r_{\text{т}}$ - теплота топлення льоду, 332,8 кДж/кг.

Оскільки теплопровідність шару суспензії при переході від рідкої до твердої фази різко міняється, то нове значення теплопередачі буде становити:

$$К = 1/(1/700+0,0005/0,036+0,005/(0,62+2,33/2)) = 53,45 \text{ Вт/(м}^2\cdot\text{К)}$$

де 2,33 - теплопровідність льоду, Вт/(м^2·К).

За умови, що температури холодоносія на вході і виході з холодильної машини не міняються, не міняється також температура суспензії в процесі заморожування (0 °С) і процес є стаціонарним, середня різниця температур становить:

$$\Delta t_{\text{сер}} = 27\text{-}10/\ln(27/10) = 17,1 \text{ °С}$$

Час заморожування становить: $\tau = 2329,6\times10^3/53,45\times43,3\times17,1 = 58,8$ с = 0,016 год.

Визначення часу охолодження шару льоду від температури 0 °С до -27°С.

Процес теплопередачі нестаціонарний.

Загальна кількість тепла, яку потрібно зняти при охолодженні шару льоду,

$$Q_3 = G\, c_{рл}\, (0 + 27) = 7 \cdot 2{,}14 \cdot 27 = 404{,}5 \text{ кДж}.$$

Тепло, яке потрібно зняти при охолодженні металевих конструкцій камери становить:

$$Q_{3к} = 30 \cdot 0{,}45 \cdot 27 = 364{,}5 \text{ кДж}.$$

Всього потрібно зняти 404,5 + 364,5 = 769 кДж тепла.

Приймемо, що температура на виході нагрітого холодоносія наприкінці охолодження льоду становить -30 °С. Тоді

$$\text{A} = \frac{-27 - (-32)}{-27 - (-30)} = 1{,}67$$

$$\Delta t_{сер.ох} = (0+27/\ln(0+30/-27+30))\times(1{,}67-1/1{,}67\ln 1{,}67) = 9{,}2 \text{ °C}$$

Коефіцієнт теплопередачі:

$$\text{K} = 1/(1/700+0{,}0005/0{,}036+0{,}005/2{,}33) = 57{,}3 \text{ Вт/(м}^2\cdot\text{К)}$$

Час охолодження: $\tau = 769\times10^3/57{,}3\times43{,}3\times9{,}2 = 33{,}69$ с = 0,0093 год.

Загальний час охолодження суспензії, її заморожування та охолодження льоду становить 0,00583+0,016+0,0093=0,03113 год.

III. Визначення часу сублімації

Маса вологи, що підлягає сублімації, за цикл сублімації дорівнює

$$\Delta M = 5{,}07/1 = 5{,}07 \text{ кг}$$

Час проведення сублімації $\tau_c = 5{,}07/[5 \cdot 10^{-6}(100-15)\cdot 43{,}3] = 275{,}5$ с = 0,076 години.

Загальний час проведення технологічного циклу без урахування додаткового часу на обслуговування апарата 0,03113+ 0,076 = 0,107 години.

6.13. Розрахунок фасувально-пакувального обладнання

Маса готового продукту, що йде на фасування:

$G_{гп} = 1929{,}8$ г

Маса готового препарату, що фасується в 1 пакетик саше $G_{крф} = 0{,}25$ г. Кількість саше за цикл $N_ц = 1929{,}8/0{,}250 = 7720$ шт.

Використовується напіватомат-дозатор з продуктивністю $G_{ав} = 3000$ пакетів за годину. Час фасування партії готового препарату

$\tau_ф = G_{гп}/G_{ав} = 7720/3000 = 2{,}57$ год.

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Специфікація виробництва пробіотику на основі біомаси *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Д-1, Д-4, Д-7, Д-45	Дозатор об'ємно-ваговий (рідини)	4	Електронний дозатор Serv_W21 (Україна) (дозатор-змішувач) проточного типу призначений для автоматичного дозування рідин без механічних включень. Технічні характеристики дозатора: - Обсяг дозуючої рідини, л: 0,1 до 999,9; - Дискретність встановлення дози, л: 0,1 або 1; - Відносна похибка дозування, %: ±1,5; - Температура рідини на вході дозатора, ^{o}C: від 1 до 80; - Напруга живлення частотою 50 Гц, В: 220±10%; - Споживана потужність, ВА, не більше: 30 [77].
М-2, М-5, М-19, М-26, М-30 М-36, М-40	Мірник	7	Мірники виготовлені з нержавіючої сталі, мають шкалу, яка розташована у віконці по всій висоті виробу, а також, кожен мірник проходить державну метрологічну перевірку. Точність виробів,%: 0,02 - 0,5. Об'єми мірників – 2, 5, 10, 20, 50 та 100 л [78].
РЗ-3	Реактор-змішувач для приготування розчину «Санікон»	1	Реактор об'ємом 250 л фірми «Промвіт» (Україна). Корпус реактора, являє собою вертикальну циліндричну ємність з псевдоеліптичним днищем і кришкою. Поточна температура в корпусі реактора, виводяться на дисплей терморегулятора в цифровому вигляді.

			На кришці реактора розташовані: привід мішалки, люк, ліхтар з підсвічуванням, штуцера під «клемп» різних прохідних перетинів. Мішалка має регулятор для плавної зміни швидкості обертів обертання мішалки за допомогою частотного інвертора. Швидкість перемішування 50 об/хв. Ущільнення мішалки - торцеве. Проконтролювати обсяг завантаженого компонента можна за допомогою цифрового індикатора «Обсяг продукту» з дискретністю 100 мл, встановленого на пульті управління, який підключений до «Перетворювач тиску UT-11» розташованому в днищі реактора (початково перетворювач тиску UT-11 запрограмований на вимір обсягу води) . Датчик манометричного типу в асептичному виконанні і прилад для візуалізації даних (контролер) відомої німецької фірми WIKA [79].
РЗ-6	Реактор-змішувач для приготування розчину «Vasept Forte»	1	Реактор об'ємом 400 л фірми «Діоніс» (Україна). Технічні характеристики: - Номінальний об'єм корпусу, л: 400; - Робочий об'єм корпусу, л: 320; - Частота обертання мішалок, об / хв: плавно регульована від 0 до 80. - Встановлена потужність, при U = 380 В, кВт - Електродвигуна приводу: 3,5; - Матеріали виготовлення корпусу, кришки, мішалки: н / ж сталь 08Х18Н10Т, (AISI 321) - Діаметр, мм: d = 800. - Маса, кг 630,0 [80].
Д-18, Д-25, Д-29, Д-35, Д-39	Дозатор об'ємно-ваговий (сипучі речовини)	5	Дозатор VD1-V8 (Україна). Технічні характеристики: - Обсяг дозуючої речовини - 0,2-40 кг; - Довжина / Ширина / Висота, мм - 1100/1000/1800; - Електроживлення, В/Гц - 220/50; - Споживання електроенергії, кВт/год: 0.7; - Вага: 90 кг [81].
Ф-8, Ф-22, Ф-27, Ф-32,	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	6	Фільтр Д-23. Фільтрувальний матеріал – ФП (фільтр Петрянова), пропускна здатність – 3400 $м^3$/год, ступінь очищення Е=99,999 %. Виробник: «Вентиляторний завод «Укрвентсистеми» [82].

Ф-37, Ф-42			
РЗ-9	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації захисного середовища	1	Реактор об'ємом 10 л фірми «Флагма» (Україна). Матеріали виготовлення всіх вузлів, що контактують з продуктом - сталь AISI 316L. Технічні характеристики: - Номінальний об'єм, л – 10,0; - Частота обертання мішалки, об/хв: 25-55; - Напруга в електромережі, В: 220; - Потужність приводу мішалки, Вт: 150; - Тип ущільнення мішалки: торцьове [83].
Н-10	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий DAB KPF (Україна). Потужність двигуна – 0, 370 кВт; Продуктивність – 0,06 $м^3$/год; Висота подачі – 25 м [84].
ПЗ-11, Ф-12	Пристрій для забору повітря з вбудованим фільтром грубої очистки	1	Пристрій для забору повітря Systemair TLP 200/5.0, Швеція. Основні технічні характеристики: - Вбудований повітряний фільтр – G4; - Електропідключення - 220 V / 50 Hz; - Частота обертання - 2578 об/мин; - Ступінь захисту - IP44; - Маса - 40,5 кг [85].
В-13	Вентилятор	1	Відцентровий вентилятор Ostberg TKS 300 A, Швеція. Основні технічні характеристики: - Тип воздуховоду – прямокутній; - Тип вентилятора – відцентровий; - Частота обертання – 2760 об/хв; - Продуктивність - до 986 $м^3$/год [86].
Ф-14	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки ФЯК F9 592х490х600-8 класу F9. Основні технічні характеристики: - Вид рамки – оцинкована; - Фільтруючий матеріал - поліестер+спанбонд; - Максимальна робоча температура: 60-70°С; - Ступінь очищення становить 90- 99 % ; - Кількість карманів – 8 шт.[87].
Т-15	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Salda AVA 200, Литва. Посадковий діаметр, мм - 200 Призначений для витрати повітря, $м^3$ / год: 230-700. Круглий водяний охолоджувач Salda AVA використовується в системах вентиляції для надходження холодного повітря. Даний тип

Продовження таблиці 7.1

			охолоджувачів виготовлений з мідних трубок і алюмінієвих пластин. Корпус виготовлений з якісної оцинкованої бляхи. В даному водяному охолоджувачі є система дренажу конденсату [88].
Т-16	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітронагрівач водяний НКВ 125-2, Україна. Водяний нагрівач припливного повітря Вентс НКВ 125-2 складається з корпусу, який виконаний з оцинкованої сталі і теплообмінник, з мідних трубок, поверхня теплообміну - з алюмінієвих пластин Для герметичного з'єднання з повітроводами нагрівачі забезпечені гумовими ущільнювачами. Нагрівачі випускаються в двох-або чотирирядною виконанні і призначені для експлуатації при максимальному робочому тиску 1,6 МПа (16 бар) і максимальній робочій температурі води + 100 ° С. На вихідному колекторі нагрівача передбачений патрубок для установки погружного датчика вимірювання температури або захисту від обмороження калорифера [89].
Ф-17	Фільтр високоефективного очищення	1	Фільтр високоефективної очистки Н12 фірми VOLZ Luftfilter, Німеччина. Фільтруючий матеріал: скловолокно. Робоча температура до +65°С. Ступінь очищення 99,9% [90].
РЗ-20, РЗ-31	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	2	Реактор об'ємом 5 л фірми «Промвіт» (Україна). Корпус обладнаний верхньою якірною мішалкою з розвиненою поверхнею перемішування з плаваючими шкребками з тефлону і нижньою турбінної мішалкою. Для керованого нагріву продукту корпус реактора оснащений водяною сорочкою з електропідігрівом. Матеріали виготовлення всіх вузлів, що контактують з продуктом - сталь AISI 316L. Технічні характеристики: - Номінальний об'єм, л – 5,0; - Частота обертання мішалки, об/хв: 25-55; - Напруга в електромережі, В: 220; - Потужність приводу мішалки, Вт: 150; - Тип ущільнення мішалки: торцьове; - Вивантаження продукту через вентиль нижнього спуску санітарного виконання. - Габаритні розміри, мм: В = 400; L = 660; Н = 940; - Маса, кг: 65 [91].
ЗП-21	Засівний пристрій	1	Збірник циліндричний із днищем з нижнім спуском. Об'єм – 1 л.
ФР-23	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер Biostat® C-DCU (Німеччина) з номінальним об'ємом 10 л. Технічні характеристики:

			- Ємність з нержавіючої сталі з торосферичним дном з нижнім перемішуванням; - Відношення розмірів, H:D: 2:1; - Має поздовжнє оглядове віконце; - Матеріал, що контактує з продуктом - нержавіюча сталь AISI 316L, EPDM, боросилікатне скло; зовнішній - нержавіюча сталь AISI 304; - Мішалка: 3-х лопатева сегментна; - Температура стерилізації до 130^{o}C; - Має контролер приводу мішалки; - Швидкість перемішування 20-1500 об/хв [92].
Н-24, Н-34, Н-44, Н-47	Насос відцентровий закритого типу	4	Відцентровий насос CM004 / PP (Італія) з магнітною муфтою закритого типу. Призначений для перекачування агресивних хімічних, високочистих рідин і рідин, які важко ущільнювати. Технічні характеристики: - Магнітний привід відцентрових насосів серії Compass виготовлений з поліпропілену і PVDF; - Максимальная подача, м.куб/год – 3.5; - Потужність, кВт: 120W [93].
Р3-28	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор об'ємом 30 л фірми «Промвіт» (Україна). Технічні характеристики: - Матеріал обшивки і зовнішніх панелей: сталь AISI 304; - Робочий тиск в корпусі, бар: атмосферний, корпус герметичний; - Температура в сорочці, ^{o}C: від +5 до +95; - Габаритні розміри, мм, не більше: B = 700; L = 1200; H = 1500; - Тип мішалки: якірна не симетрична мешалка. На валу мішалки розташовані додаткові лопаті з розворотом робочих площин під 45^{o}, що забезпечують ефективне перемішування; - Місце установки приводу мішалки: на кришці реактора, по центру; - Швидкість обертання мішалки: 35 - 80 об/хв, плавно-регульована, нереверсивна. - Потужність двигуна приводу, кВт, не більше: 0,75. [94]. -

Продовження таблиці 7.1

ФР-33	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер Biostat® C-DCU (Німеччина) з номінальним об'ємом 100 л. Технічні характеристики: - Ємність з нержавіючої сталі з торосферичним дном з нижнім перемішуванням; - Відношення розмірів, H:D: 3:1; - Має поздовжнє оглядове віконце; - Матеріал, що контактує з продуктом - нержавіюча сталь AISI 316L, EPDM, боросилікатне скло; зовнішній - нержавіюча сталь AISI 304; - Мішалка: 6-ти лопатева сегментна; - Температура стерилізації до 130^{o}C; - Має контролер приводу мішалки; - Швидкість перемішування 20-700 об/хв [92].
РЗ-38	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор об'ємом 160 л фірми «Діоніс» (Україна), оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Технічні характеристики: - Номінальний об'єм корпусу, л: 160; - Частота обертання мішалок, об / хв: плавно регульована від 0 до 100. - Матеріали виготовлення корпусу, кришки, мішалки: н / ж сталь 08Х18Н10Т, (AISI 321) - Тип ущільнення мішалки: торцьове; - Вивантаження продукту через вентиль нижнього спуску санітарного виконання. - Габаритні розміри, мм: L x B x H: 740x600x1220 [95].
РЗ-41	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор об'ємом 20 л фірми «Промвіт» (Україна). Матеріали виготовлення всіх вузлів, що контактують з продуктом - сталь AISI 316L. Технічні характеристики: - Номінальний об'єм, л – 20,0; - Частота обертання мішалки, об/хв: 25-55; - Напруга в електромережі, В: 220; - Потужність приводу мішалки, Вт: 150; - Тип ущільнення мішалки: торцьове [96].
ФР-43	Ферментер	1	Ферментер Biorus 1000 л (Росія). Технічні характеристики:

			- Номінальний об’єм, л: 1000; - Робочий об’єм, л: 700; -Сорочка з ізоляцією для термостатування і подачі пари, ферментер стерилізується на місці; - Внутрішня поверхня шорсткістю не більше 0,8 мкм; -Апарат виготовлений з нержавіючої сталі 304. - Вал з трьома мішалками; - Подвійне механічне ущільнення з шаровим затвором; -4 відбійника, 10% від внутрішнього діаметра ємкості; - Швидкість перемішування 50-300 об / хв; - Відношення розмірів, H:D: 3:1; - Датчики: - pH датчик, Температурний датчик; - Система циркуляції [97].
РЗ-46	Реактор-змішувач для культуральної рідини	1	Збірник об’ємом 250 л фірми «Промвіт» (Україна). Корпус реактора, являє собою вертикальну циліндричну ємність з псевдоеліптичним днищем і кришкою. Поточна температура в корпусі реактора, виводяться на дисплей терморегулятора в цифровому вигляді. На кришці реактора розташовані: привід мішалки, люк, ліхтар з підсвічуванням, штуцера під «клемп» різних прохідних перетинів. Мішалка має регулятор для плавної зміни швидкості обертів обертання мішалки за допомогою частотного інвертора. Швидкість перемішування 50 об/хв. Ущільнення мішалки - торцеве. Проконтролювати обсяг завантаженого компонента можна за допомогою цифрового індикатора «Обсяг продукту» з дискретністю 100 мл, встановленого на пульті управління, який підключений до «Перетворювач тиску UT-11» розташованому в днищі реактора (початково перетворювач тиску UT-11 запрограмований на вимір обсягу води) . Датчик манометричного типу в асептичному виконанні і прилад для візуалізації даних (контролер) відомої німецької фірми WIKA [98].
С-48	Сепаратор	1	Сепаратор для біотехнології МВРХ 810Н фірми ООО "БИОТЕХНО" (Білорусь). Технічні характеристики: - Максимальна пропускна здатність - 15 $м^3$/год; - Максима пропускна здатність твердої фази

			- 600 л/год; - Температура середовища, що подається -0 - 100°С; - Об'єм ротора - 15 л; - Швидкість ротора - 6250 об./хв.; - Об'єм твердої фази - 5,0/9,8 л; - Максимальне прискорення - 8624 g; - Встановлена потужність двигуна - 15/18,5 кВт; - Час запуску - 5 хв.; - Час зупинки без тормоза (приблизно)- 16 хв; - Рівень звукового тиску - 76 дБ(А); - Швидкість обертання двигуна, синхр. 50 Гц - 1500 об./хв.; - Матеріали - 1.4401 UNS 31600 (нерж. сталь); - Габаритні розміри (В×Д×Ш) - 1555×1622×1255 мм; - Вага брутто – 2000 кг [99]
РЗ-49	Реактор-змішувач для приготування напівфабрикату	1	Реактор об'ємом 20 л фірми «Промвіт» (Україна). Матеріали виготовлення всіх вузлів, що контактують з продуктом - сталь AISI 316L. Технічні характеристики: - Номінальний об'єм, л – 20,0; - Частота обертання мішалки, об/хв: 25-55; - Напруга в електромережі, В: 220; - Потужність приводу мішалки, Вт: 150; - Тип ущільнення мішалки: торцьове [96].
СС-50	Сублімаційна сушарка	1	Сублімаційна сушарка FD 10 компанії SiccaDania, Данія. Основні технічні характеристики: - Загальна площа лотка - 0,5 $м^2$; - Кількість лотків - 6 шт.; - Вхідна ємність - 10 кг; - Ємність охолоджуючої котушки - 10 кг H_2O; - Максимальна сублімаційна здатність - 1,6 кг H_2O/год; - Матеріал контактних сталевих деталей - AISI 316; - Розміри, ШхДхВ - 1,8х0,8х1,7 м [100].
ДР-51	Валкова дробарка	1	Валкова дробарка Lump Breaker NW300 фірми Gebr. Jehmlich GmbH, Німеччина. Основні технічні характеристики: - Максимальний розмір грудочки- до 280 мм;

			- Кінцевий розмір часточок - 0,5 – 20 мм; - Максимальна потужність - 100 кг/год; - Вага - 350 кг; - Асептичні умови - GMP сумісний, CIP через автоматичний витяг ролика; - Матеріал, що контактує з продуктом - 1.4462; 1.4404; - Ударний тиск - 10 Бар; - Ущільнення - Силікон, PTFE; - Фланці - DIN 24154 T2, 300 мм [101].
ФПМ-52	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна машина Sigpack RA, компанії Syntegon, Німеччина. •Точність дозування та менші втрати продукту. Машина буде швидко амортизована завдяки точному дозуванню та високій ефективності. • Висока швидкість. До 3 000 пакетиків в хвилину. •Оптимальна доступність, просте керування та швидке очищення за допомогою «поворотного» дозатора та модульної конструкції [102].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва пробіотику на основі біомаси *L.plantarum* 337Д УКМ В-2627 включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка і стерилізація допоміжних розчинів та поживних середовищ, приготування захисного середовища, підготовка вентиляційного повітря) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, біосинтез, відділення біомаси від культуральної рідини, стабілізація біомаси, сушіння біомаси, подрібнення та просіювання сухого препарату, а також пакування та маркування готового продукту).

Технологічну схему виробництва пробіотику наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

ДР 1.1. Підготовка та навчання персоналу.

Оскільки система якості включає персонал, то необхідно мати достатню кількість кваліфікованого персоналу, який здатний на належному рівні вирішувати всі задачі, які знаходяться в сфері відповідальності підприємства. Кожен працівник має чітко знати свої повноваження та обов'язки, а також ясно розуміти індивідуальну відповідальність. Кожен працівник повинен знати і виконувати правила GMP при виконанні своїх посадових обов'язків. Всі працівники при прийомі на роботу зобов'язані пройти ретельний інструктаж про принципи та правила GMP, включаючи правила особистої гігієни, потім в ході своєї діяльності вони повинні регулярно підвищувати кваліфікацію і проходити всебічне навчання, яке відповідає їх професії. До того ж персонал, який працює в чистих приміщеннях, є активним джерелом забруднень. Проблема захисту ліків від забруднень, джерелом яких є персонал, вирішується завдяки особистій гігієні співробітників і використанню технологічної одежі. До працюючих у

"чистих" зонах необхідно висувати високі вимоги у відношенні особистої гігієни та чистоти.

Персонал, знаходячись у виробничих приміщеннях, має бути вдягненим у спеціальний одяг, який відповідає виконуваним операціям. Головне призначення технологічного одягу робітників - максимально захистити продукт виробництва від вторинної контамінації мікроорганізмами і механічними частками, що виділяються персоналом. Технологічний одяг персоналу має відповідати класові чистоти тієї зони, в якій він працює. Одяг в чистих приміщеннях класу В використовується протягом однієї зміни.

В чистих зонах повинна бути присутня лише мінімальна кількість необхідного персоналу; це особливо важливо при проведенні технологічного процесу в асептичних умовах. Інспектування і контроль, наскільки можливо, слід здійснювати ззовні чистих зон.

Весь персонал (включаючи співробітників, які займаються прибиранням і технічним обслуговуванням), який працює в таких зонах, повинен регулярно проходити навчання з дисциплін, пов'язаних з належним виробництвом стерильної продукції, включаючи питання гігієни й основи мікробіології. Якщо необхідно, щоб сторонні співробітники, які не пройшли такого навчання (наприклад, працюючі за контрактом будівельники або наладчики обладнання), знаходилися в чистому приміщенні, то вони мають бути докладно проінструктовані й за ними має бути встановлений суворий нагляд.

Персонал, який бере участь в обробці сировини з тканин тварин або працює з культурами мікроорганізмів, які не використовуються в поточному технологічному процесі, не повинен входити в зони виробництва стерильної продукції, якщо він не дотримується суворих і чітко встановлених методик щодо входу.

Переодягатися і митися необхідно згідно з письмовими методиками, розробленими так, щоб зводити до мінімуму ризик контамінації одягу для роботи в чистих зонах і попередити внесення забруднення в чисті зони.

У чистих зонах не допускається носити наручні годинники і ювелірні прикраси, а також використовувати косметику.

Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу, і класу робочої зони. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації.

Опис необхідного одягу для кожного класу наведено нижче.

Клас С: волосся, а також борода і вуса (при їх наявності) мають бути закриті. Необхідно носити комбінезон або брючний костюм, що щільно прилягає на зап'ястях і має високий комір, а також відповідне взуття або бахіли. Від них практично не повинні відокремлюватися волокна або часточки.

Клас А/В: головний убір повинен цілком закривати волосся, а також бороду і вуса (при їх наявності); він має бути вставлений у комір костюма; необхідно на обличчі носити маску для запобігання поширенню крапельок. Слід носити відповідним чином простерилізовані та ненапудрені гумові або пластикові рукавички і простерилізовані або продезінфіковані бахіли. Нижні краї штанів мають бути встановлені в бахіли, а рукава одягу - у рукавички.

Захисний одяг практично не повинен виділяти волокна або часточки і повинен затримувати часточки, що відокремлюються від тіла.

Повсякденний одяг забороняється вносити в кімнати для переодягання, що ведуть у приміщення класів В і С. Кожен робітник у зоні класу А/В повинен бути забезпечений чистим стерильним (простерилізованим або таким, що пройшов відповідну санітарну обробку) захисним одягом для кожної зміни або принаймні на один день, якщо це виправдано результатами контролю. Рукавички під час роботи потрібно регулярно дезінфікувати.

Маски і рукавички необхідно змінювати принаймні кожну зміну.

Одяг персоналу для чистих приміщень необхідно очищати і поводитись з ним так, щоб він не забруднювався, що попереджує можливу контамінацію продукції. Основним методом обробки одягу є прання і термічна стерилізація.

ДР 1.2. Підготовка мийних та дезинфікувальних засобів.

ДР 1.2.1. Приготування мийно-дезинфікуючого розчину «Санікон».

Засіб «Санікон» використовують для миття приміщень, інвентарю та тари. Для приготування розчину «Санікон» небхідно розбавити концентрований засіб водою до потрібної концентрації. Для приготування 0,2 % розчину у реактор-змішувач (РЗ-3) об'ємом 250 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-1) вносять 8,7 л 5,5% розчину «Санікон» та за допомогою мірника (М-2) вносять 231,3 л питної води, далі перемішують. Робочий розчин «Санікон» може зберігатись до 30 діб.

ДР 1.2.2. Приготування мийно-дезинфікуючого розчину «Vasept forte».

Засіб «Vasept forte» використовують для миття обладнання, інвентарю, комунікацій та тари. Для приготування розчину «Vasept forte» небхідно розбавити концентрований засіб водою до потрібної концентрації. Для приготування 0,5 % розчину у реактор-змішувач (РЗ-6) об'ємом 400 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-4) вносять 33 л 5 % розчину «Vasept forte» та за допомогою мірника (М-5) вносять 297 л питної води, далі перемішують.

ДР 1.3. Підготовка приміщень.

ДР 1.3.1. Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання приміщень проводять 1 раз на 5 днів (в день профілактики обладнання) або негайно на вимогу бактеріолога у випадку виявлення мікробної контамінації. Для обробки використовують 0,2 % мийно-дезинфікуючий розчин «Санікон». Перед обробкою обезточують все обладнання та електроприлади. Стелю, стіни, двері, вікна, перегородки та обладнання оброблюють шляхом зрошення із гідропульта. Після закінчення зрошення приміщення закривають на 10-20 хв, після чого залишки розчину видаляють шляхом протирання чистою безворсовою серветкою. Для знезараження повітря після генерального прибирання вмикають бактерицидні лампи. Проводиться прибирання і наведення порядку в шафах, стелажах.

ДР 1.3.2. Щоденне прибирання виробничих приміщень.

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом: із приміщень видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва, невикористані матеріали. Вологе прибирання приміщень проводять миючим засобом, цим же розчином миють підлогу. Особливо дуже ретельно протирають дезрозчином ручки і нижні частини дверей. Обробку ведуть в гумових рукавичках, чоботах, фартусі. Зовнішні двері промивають по мірі необхідності, але не рідше 1 разу в тиждень. Вологе прибирання приміщень проводять за 1,5-2 год до початку роботи або за 30 хвилин до закінчення роботи. Після закінчення вологого прибирання для знезараження повітря вмикають настінні або настельні бактерицидні лампи (за відсутності людей) та за 30 хвилин до початку роботи –виключити їх. Кількість ламп розраховують, виходячи із загальної площі і об'єму приміщення. Про заміну і режим роботи ламп ведуть запис в журналі. Відпрацьовані розчини зливають у каналізаційну систему. Вимиті приміщення закривають і маркують.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій.

ДР 1.4.1. Миття.

Обробку технологічного обладнання та комунікацій проводять з розчином 0,5 % «Vasept forte», який надходить від реактора-змішувача (РЗ-6) при температурі 30 ^{o}С протягом 20-30 хв. Після дезінфекції проводять мікробіологічний контроль.

Безпосередньо перед початком проведення технологічного процесу, збірники, установки та матеріальні лінії промивають очищеною водою та стерильним паром. Обладнаннння маркують. Відпрацьований розчин направляється на знешкодження відходів.

Внутрішні частини обладнання обробляють у розчині миючого засобу при температурі (50-60) ^{0}С, потім обполіскують кілька разів очищеною водою. Іноді внутрішні частини обладнання протирають серветкою, змоченою 76% розчином спирту етилового.

Зовнішні поверхні устаткування обробляють, як і виробничі приміщення.

ДР 1.4.2. Технічний огляд.

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання (збірників та реактора) проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

Також проводять технічний огляд після миття та ополіскування устаткування для виділення та очищення з метою виявлення технічних несправностей.

ДР 1.4.3. Дезинфекція та ополіскування.

Ополіскування проводиться очищеною водою. З'ємні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо стикаються з виробничою сировиною, слід зняти, розібрати і ретельно вимити в розчином «Vasept forte» при температурі 30 °С упродовж 30 хв. Відпрацьована вода йде до знешкодження відходів.

ДР 1.4.4. Перевірка на герметичність ємнісного обладнання.

Наступна стадія підготовки обладнання (інокуляторів, посівних апаратів, ферментера) до стерилізації полягає в перевірці їх на герметичність. Для цього на апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску Р = 0,1 - 0.2 МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями.

Для цього використовують такі методи. Найпростіший - «омилювання» місць з'єднань. Готують мильний розчин і резиновою грушою оприскують всі місця з'єднань. У разі появи в місцях вприскування дрібних мильних бульбашок фіксують це місце і здійснюють підтягування різьбового з'єднання. Якщо ця операція не дала позитивного результату, міняють

прокладку і операцію «омилювання» повторюють. Процес здійснюють до ліквідації усіх виявлених неущільнень.

Проте такий метод є трудомістким та йому притаманні ряд недоліків (необхідність створення достатньо високого тиску в апараті, неможливість контролю при підвищених температурах поверхностей апарата та вузлів, неможливість перевірки важко доступи их вузлів).

Сучасніший метод перевірки на герметичність базується на використанні галогенових течієпошукачів. Прилад укомплектований тонким щупом та вимірювачем вмісту галогену. Перед набором тиску в апарат вносять (поміщають) невелику кількість леткої галогенвмісної речовини, зазвичай чотирихлористий карбон ($CC1_4$), шестифтористий сульфур (SF_6) або фреон-12, закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80°С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють операції з їх ліквідації як описано вище.

ДР 1.4.5. Стерилізація ємнісного обладнання.

Стерилізація устаткування здійснюється гострою парою при температурі 130 ^oC і надлишковому тиску 0,3 МПа. Тривалість операції складає приблизно 60 хв. Параметри стерилізації забезпечують знищення мікрофлори.

Процес умовно поділяють на три етапи: нагрів апарата, витримування за температури стерилізації (стерилізація) та охолодження.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів.

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 10 л.

Під витяжною шафою у колбу об'ємом 100 мл вносять 10 мл дистильованої води. Потім за допомогою піпетки при постійному

перемішування додають 2 мл 37% розчину HCl. Обов'язково рідини змішують у такому порядку, а не навпаки (для уникнення сильної екзотермічної реакції). Після змішування колбу закривають скляною пробкою.

ДР 2.1.2. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 100 л.

Під витяжною шафою у колбу об'ємом 250 мл вносять 102 мл дистильованої води. Потім за допомогою циліндра при постійному перемішування додають 20 мл 37% розчину HCl. Після змішування колбу закривають скляною пробкою.

ДР 2.1.3. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 1 м^3.

Під витяжною шафою у колбу об'ємом 2 л вносять 1070 мл дистильованої води. Потім за допомогою циліндра при постійному перемішування додають 210 мл 37% розчину HCl. Після змішування колбу закривають скляною пробкою.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації pH середовища в посівному апараті на 10 л.

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 0,72 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 100 мл, доливають 11,2 мл дистильованої води. Після змішування колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131^{0}C упродовж 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування 6% розчину NaOH для стабілізації pH середовища в посівному апараті об'ємом 100 л

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 7,3 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 250 мл, доливають 114,2 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131^{0}C упродовж 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування 6% розчину NaOH для стабілізації pH середовища в ферментері об'ємом 1 м^3.

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 76,8 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 2 л, доливають 1198 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131^{0}С упродовж 40 хв.

ДР 3. Підготовка захисного середовища.

ДР 3.1. Приготування та стерилізація захисного середовища.

Для приготування 3,5 л захисного середовища за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-7) у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-9) додають 140 г сухого желатину. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за температури 40 ^{o}С за допомогою мірника (М-8) додають 1,4 л дистильованої води. Розчин ретельно перемішують і залишають для набухання на 3 год, після чого підігрівають розчин до 50-60^{o}С та перемішують до повного розчинення. Після чого стерилізують в реакторі при температурі 130^{o}С (тиск 0,18 МПа) на протязі 2 год.

Паралельно з процесом приготування желатози, окремо готують сахарозо-молочний розчин. Для цього на попередньо відтарованих вагах зважують 280 г сахарози, 210 г сухого знежиреного молока, з наступним перенесенням у стерильну ємкість та додають 2,03 л дистильованої води температурою 35-40^{o}С. Суміш ретельно перемішують до отримання однорідної маси.

Простерилізовану желатозу охолоджують до температури 45-50^{o}С та додають приготований сахарозо-молочний розчин за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-7). Для отримання однорідної маси додатково вмикають мішалку. Після отримання однорідного розчину захисного середовища, його стерилізують при температурі 112-115^{o}С упродовж 20-30 хв. Після процесу стерилізації масу охолоджують до температури 35-40^{o}С, яка підтримується до моменту змішування з біомасою. На цьому етапі здійснюють контроль на

стерильності отриманого захисного середовища шляхом висіву на МПА і середовище Сабуро. На середовищах повинен бути відсутній ріст мікробіоти.

ДР 4. Підготовка вентиляційного повітря.

ДР 4.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору зовнішнього повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини та ін). Забір повітря проводиться за допомогою повітрозабірника (ПЗ-11). Забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 20 – 30 м.

ДР 4.2. Грубе очищення повітря

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром понад 10 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують – фільтри грубої очистки G 3 (Ф-12), злегка змащене пружне скловолокно спеціального плетіння. Всередині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить Е =80%.

ДР 4.3. Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки

Попередня фільтрація відбувається на фільтрі F 9 (Ф-14), який призначений для попередньої очистки повітря від великодисперсних часток розміром більше 5 мкм (великий пил, продукти корозії), а також для захисту більш ефективного фільтру тонкої очистки. Ступінь очищення повітря 98%.

ДР 4.4. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря за допомогою вентилятора (В-13) подається до кожухотрубного теплообмінника (Т-15), охолоджується за допомогою хладоагенту фреону або підігрівається до 21–23^0 С за допомогою теплообмінника-нагрівача (Т-16) в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря. Вологість повітря повинна перебувати в межах 30-60%. Після цього етапу очищене повітря поступає до приміщень класу чистоти С.

ДР 4.5. Очищення повітря на фільтрах тонкої очистки

Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється на фільтрах тонкої очистки HEPA 12 (Ф-17). Після нього повітря направляється до приміщень класу чистоти В.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 540 мл поживного середовища . Джерелом вуглецю в середовищі є глюкоза, джерелом азоту – дріжджовий екстракт. Вміст компонентів для приготування 540 мл середовища наведено у табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для робочого об'єму 600 мл середовища, г (мл)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, мл**
Дріжджовий екстракт	5	3	А	348
М'ясний екстракт	10	6		
Гідролізат казеїну	10	6		
Глюкоза	20	12		
Твін 80	1	0,6		
Вода		420		
Ацетат натрію	5	3	Б	89
Цитрат амонію	2	1,2		
K_2HPO_4	2	1,2		
Вода		84		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,12	В	103
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,05	0,03		
Вода		3		
Разом:		**540**		**540**

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 12 г глюкози, 3 г дріжджового екстракту, 6 г м'ясного екстракту, 6 г гідролізату казеїну та 0,6 г Твін 80. Наважки вносять в колбу об'ємом 1 л, додають 348 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112^0С упродовж 30хв.

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 3 г ацетат натрію, 1,2 г цитрат амонію та 1,2 г K_2HPO_4. Наважки переносять у колбу об'ємом 250 мл та додають 89 мл дистильованої води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131^0С упродовж 40 хв.

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 0,12 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$. Наважку вносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 103 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131^0С упродовж 40 хв.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 10 л.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 6,7 л поживного середовища (враховуючи, що 10% (0.6 л) від об'єму середовища припадає на посівний матеріал). Також враховуємо 0,46 л конденсату, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті. Вміст компонентів для приготування 6,1 л поживного середовища наведено у табл. 8.2.

Таблиця 8.2

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для робочого об'єму 6700 мл середовища, г (мл)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, мл**
Дріжджовий екстракт	5	33,5	А	1780
М'ясний екстракт	10	67		
Гідролізат казеїну	10	67		
Глюкоза	20	134		
Твін 80	1	6,7		
Вода		1473		
Ацетат натрію	5	33,5	Б	3860
Цитрат амонію	2	13,4		
K_2HPO_4	2	13,4		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	1,34		
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,05	0,34		
Вода		3798		
Конденсат		460		460
Разом:		**6100**		**6100**

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах в попередньо відтарованій тарі зважують 134 г глюкози, 33,5 г дріжджового екстракту, 67 г м'ясного екстракту, 67 г гідролізату казеїну та 6,7 г Твін 80. Наважки поміщають у колбу об'ємом 3 л, додають 1473 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112^0C упродовж 30хв. Потім вміст колб переносять в посівний апарат об'ємом 10 л (ФР-23).

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-18) у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-20) додають 33,5 г ацетат натрію, 13,4 г цитрат амонію, 13,4 г K_2HPO_4, 1.34 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,34 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за температури 40 ^oC за допомогою мірника (М-19) додають 3,8 л питної води. Після розчинення солі композиції Б подаються в посівний апарат об'ємом 10 л (ФР-23), де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від *ДР 2.1.1*). Стерилізують композицію при 131^{0}С упродовж 40 хв та тиску 0,15 МПа.

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті 100 л.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 61 л поживного середовища, враховуючи конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті (6,1 л). Також додатково 6 л середовища припадає на посівний матеріал. Вміст компонентів для приготування 61 л поживного середовища наведено у табл. 8.3.

Таблиця 8.3

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у посівному апараті об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для робочого об'єму 67 л середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Дріжджовий екстракт	5	0,335	А	21,8
М'ясний екстракт	10	0,67		
Гідролізат казеїну	10	0,67		
Глюкоза	20	1,34		
Твін 80	1	0,067		
Вода		18,73		
Конденсат		2,36		2,36
Ацетат	5	0,335	Б	33,1

Продовження таблиці 8.3

натрію				
Цитрат амонію	2	0,134		
K_2HPO_4	2	0,134		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,013		
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,05	0,003		
Вода		32,48		
Конденсат		3,74		3,74
Разом:		**61**		**61**

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-25) у реактор-змішувач об'ємом 30 л (РЗ-28) додають 1340 г глюкози, 335 г дріжджового екстракту, 670 г м'ясного екстракту, 670 г гідролізату казеїну та 67 г Твін 80. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-26) додають 18,73 л питної води. Стерилізують в реакторі-змішувачі при температурі 112^0С упродовж 30 хв та тиску 0.05 МПа. Після цього подаються в посівний апарат об'ємом 100 л (ФР-33).

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-29) у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-31) додають 335 г ацетат натрію, 134 г цитрат амонію, 134 г K_2HPO_4 , 13 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-30) додають 2,8 л питної води. Після розчинення солі композиції Б подаються в посівний апарат об'ємом 100 л (ФР-33), де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від *ДР 2.1.2*) та додатково вноситься 27 л питної води. Стерилізують композицію при 131^0С упродовж 40 хв та тиску 0.15 МПа.

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для для біосинтезу в ферментері об'ємом 1 м^3.

Для вирощування інокуляту на даній стадії необхідно 640 л поживного середовища, враховуючи конденсат, що утворюється під час стерилізації середовища в посівному апараті (64 л). Також додатково 60 л середовища

припадає на посівний матеріал. Вміст компонентів для приготування 640 л поживного середовища наведено у табл. 8.4.

Таблиця 8.4

Склад композицій для стерилізації поживного середовища у ферментері об'ємом 1 м^3

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для робочого об'єму 700 л середовища, кг (л)**	**Композиція**	**Об'єм композиції, V, л**
Дріжджовий екстракт	5	3,5	А	118
М'ясний екстракт	10	7		
Гідролізат казеїну	10	7		
Глюкоза	20	14		
Твін 80	1	0,7		
Вода		85,8		
Конденсат		11		11
Ацетат натрію	5	3,5	Б	458
Цитрат амонію	2	1,4		
K_2HPO_4	2	1,4		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,14		
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,05	0,035		
Вода		451,4		
Конденсат		53		53
Разом:		**640**		**640**

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-35) у реактор-змішувач об'ємом 160 л (РЗ-38) додають 14 кг глюкози, 3,5 кг дріжджового екстракту, 6,7 кг м'ясного екстракту, 6,7 кг гідролізату казеїну та 700 г Твін 80. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-36) додають 85,6 л питної води. Стерилізують в реакторі-змішувачі при

температурі 112^0С упродовж 30 хв та тиску 0,05 МПа. Після цього подаються в посівний апарат об'ємом 1 $м^3$ (ФР-43).

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-39) у реактор-змішувач об'ємом 20 л (РЗ-41) додають 3,5 кг ацетат натрію, 1,4 кг цитрат амонію, 1,4 кг K_2HPO_4 , 140 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 35 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$. Далі при постійному перемішуванні (50-80 об/хв) за допомогою мірника (М-40) додають 6,1 л питної води. Після розчинення солі композиції Б подаються в ферментер об'ємом 1 $м^3$ (ФР-43), де підкислюються 6%-вим розчином HCl (від *ДР 2.1.3*) та додатково вноситься 417 л питної води. Стерилізують композицію при 131^0С упродовж 40 хв та тиску 0,15 МПа.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 зберігають у флаконах (ампулах) у ліофілізованому вигляді. Кожні 3-4 місяці здійснюють пересіви. Завжди при роботі з колекційною культурою дотримуються асептичних умов.

ТП 6.2. Одержання культури І генерації в колбах на качалках

Інокулят одержують у результаті трьох послідовних пересівів (культура І, ІІ та ІІІ генерації) робочої культури лактобактерій на рідкому поживному середовищі.

У стерильну засівну колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять композицію А (*від ДР 5.1.1*), композицією Б (*від ДР 5.1.2*) та композицію В (*від ДР 5.1.3*). Для одержання культури І генерації використовують флакони (ампули) з ліофілізованою робочою культурою лактобактерій (10^8—10^9 КУО/$см^3$) (від *ТП 6.1*), у які вносять фізіологічний розчин хлориду натрію (1 $см^3$ на дозу), ретельно перемішують і переносять у колбу з поживним середовищем. Далі розливають по 270 мл в колби об'ємом 500 мл. Культуру лактобактерій вирощують у термостаті за температури (37±1) °С упродовж 12 год за періодичного перемішування.

Мікробіологічний контроль культури І генерації здійснюють мікроскопіюванням, а також висівом на МПА з 5 % глюкози і агаризоване середовище Сабуро (для виявлення сторонньої бактеріальної і грибної мікрофлори відповідно). Посіви на МПА витримують у термостаті за температури (38±1) °С упродовж 48 год, на середовищі Сабуро — за (22±1) °С протягом 72 год. Якщо сторонньої мікрофлори немає, то культуру І генерації в колбу вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л та використовують як посівний матеріал для одержання культури ІІ генерації.

ТП 6.3. Одержання культури ІІ генерації в посівному апараті об'ємом 10 л.

В посівний апарат (ФР-23), що містить композицію Б (від *ДР 5.2.2*) додають з колб композицію А (від *ДР 5.2.1*). Для нейтралізації pH в посівний апарат подають 6%-вий розчин NaOH (від *ДР 2.2.1*) і вносять посівний матеріал (від *ТП 6.2*) спочатку в засівний пристрій (ЗП-21) використовуючи факел для уникнення контамінації, а потім з нього подають в посівний апарат.

Тривалість культивування складає 12 год при 37^0С. В процесі культивування для стабілізації pH на рівні значення 7,0 використовують 6% розчин гідроксиду натрію.

Через 12 год здійснюють мікробіологічний контроль як описано вище, а також визначають концентрацію біомаси, яка має бути не нижче ніж 10^9 КУО/$см^3$.

ТП 6.4. Одержання культури ІІІ генерації в посівному апараті об'ємом 100 л.

В посівний апарат (ФР-33), що містить композицію Б (від *ДР 5.3.2*) з реактора-змішувача (РЗ-28) самоплином подають композицію А (від *ДР 5.3.1*). Для нейтралізації pH в посівний апарат подають 6%-вий розчин NaOH (від *ДР 2.2.2*) і вносять посівний матеріал через трубопровід (від *ТП 6.3*) за допомогою відцентрового насосу закритого типу (Н24).

Тривалість культивування складає 12 год при 37^0С. В процесі культивування для стабілізації pH на рівні значення 7,0 використовують 6% розчин гідроксиду натрію.

Через 12 год здійснюють мікробіологічний контроль як описано вище, а також визначають концентрацію біомаси, яка має бути не нижче ніж 10^9 КУО/$см^3$.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування.

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 700 л за таких параметрів: температура (37±1) °С; pH 6,8—7,0 (регулюють 6%-м розчином гідроксиду натрію); надлишковий тиск 0,03—0,04 МПа; тривалість 24 год. Упродовж процесу біосинтезу періодично (щогодини на 10 хв) вмикають перемішувальний пристрій (40 об/хв). В ферментер (ФР-43), де міститься композиція Б (від *ДР 5.4.2*) самоплином з реактора-змішувача (РЗ38) надходить композиція А (від *ДР 5.4.1*). Для нейтралізації pH в посівний апарат подають 6%-вий розчин NaOH (від *ДР 2.2.3*) і вносять посівний матеріал через трубопровід (від *ТП 6.4)*, за допомогою відцентрового насосу закритого типу (Н34).

Через кожні 2 год культивування з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин. Процес культивування зупиняють після стабілізації рівня pH, про що свідчить припинення витрат титрувального агента NaOH.

Далі за допомогою відцентрового насосу (Н-44) культуральна рідина перекачується в збірник (РЗ-46) для культуральної рідини для подальшої її обробки.

ТП 8. Відділення біомаси.

ТП 8.1. Сепарування культуральної рідини.

Отримана на попередніх етапах культивування культуральна рідина по трубопроводах частинами направляється в попередньо простерилізований

реакто-змішувач (РЗ-46) об'ємом 250 л, де вона додатково охолоджується до кімнатної температури. Зі реактора-змішувача (РЗ-46) культуральна рідина за допомогою насосу (Н-47) направляється до сепаратора (С-48) для процесу її розділення на біомасу та залишки поживного середовища та метаболітів (відправляються на знешкодження). Процес сепарування здійснюється за таких параметрів: швидкість обертання ротора 6000 об./хв, процес відділення триває протягом 30 хв, за температури 4^{o}С [103]. Отримана волога біомаса направляється до попередньо простерилізованого реактора-змішувача (РЗ-49) для здійснення процесу її стабілізації.

ТП 9. Отримання напівфабрикату.

ТП 9.1. Змішування захисного середовища з біомасою.

Для отримання напівфабрикату пробіотичного препарату у реактор-змішувач (РЗ-49), який містить біомасу молочнокислих бактерій, з реактора-змішувача (РЗ-9) при постійному перемішуванні (200 об/хв) додають приготоване захисне середовище від *ДР 3.1*. Процес змішування проводять за температури 35-40^{o}С впродовж 20 хв. На цьому етапі обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль напівфабрикату на відсутність сторонньої мікрофлори.

Отриманий напівфабрикат розливається у лотки площею 0,5 м^2 шаром завтовшки приблизно 5 мм. Заповнені лотки направляються на стадію сушіння.

ТП 10. Сушіння препарату.

Етап сушіння препарату складається з двох стадій: заморожування та сублімаційного сушіння.

ТП 10.1. Заморожування препарату.

Кювети з напівфабрикатом кількістю 6 шт від ТП 9 встановлюються до сублімаційної сушарки (СС-50) та герметично її закривають. Процес заморожування здійснюється за температури -60^{o}С упродовж 24 год [7, 104].

ТП 10.2. Сублімаційне сушіння.

Сублімаційне сушіння замороженого препарату розпочинається з того, що вмикається вакуумний насос, відкривається головна засувка установки і починають процес сушіння. Величина вакууму на початку висушування 26,6 Па.

Покази температури препарату, розчину теплоносія, конденсатора, а також значення величини вакууму записують що години в операційному листі.

Через 0,5 год включають систему циркуляції теплоносія. Температура його змінюється за рахунок природної циркуляції.

Через годину датчик температури теплоносія встановлюють на 25°С.

Через 30 год після початку сушіння починають плавний підігрів теплоносія на 1-2°С в год до досягнення температури теплоносія 32-34 °С. Температура препарату теж поступово підвищується на 1-2 °С за год.

При досягненні температури препарату 32-34 °С його витримують протягом 6 годин.

Величина вакууму наприкінці сублімації досягає 5,3 Па.

Загальна тривалість ліофілізації дорівнює 55-60 год.

Після завершення процесу ліофілізації відключають установку і, коли тиск у камері нормалізується, камеру заповнюють азотом.

Препарат вивантажують з камери, покривають стерильними безворсовими серветками і передають на етап подрібнення та просіювання.

ТП 11. Подрібнення та ситовий аналіз препарату.

ТП 11.1. Подрібнення та просіювання висушеної біомаси.

Отриману висушену біомасу в захисному середовищі від ТП 6 у вигляді тонких коржів подрібнюють на валковій дробарці (ДР-51). Процес подрібнення відбувається наступним чином: отримані на попередній стадії коржі живильником подаються в дробарку через завантажувальну воронку, коржі захоплюються зубчастими валками, що обертаються з однаковою швидкістю назустріч один одному, дробляться і розвантажуються вниз. Дробарка (ДР-51), яка оснащена ситом з діаметром пор 0,3 мм (дане сито

встановлене відразу після камери подрібнення дробарки), здійснює відразу після подрібнення процес просіювання отриманого продукту. Сухий порошок пробіотичного препарату з діаметром частинок 0,3 мм направляється на наступну стадію.

ПМВ 12. Пакування та маркування готового препарату.

Пакування та маркування готового препарату, а також фасування у вторинну упаковку здійснюється автоматично за допомогою фасувально-пакувальної машини (ФМП-52). Фасування в ящики коробок з пакетиками-саше здійснюється персоналом.

ПВМ 12.1. Пакування препарату.

Отриманий сухий порошок пробіотичного препарату зі стадії ТП 11.1 завантажується до фасувально-пакувальної машини (ФМП-52). Процес розпочинається з пакування препарату в пакетики-саше. Ламінований багатошаровий матеріал для формування пакетиків саше надходить на виробництво з уже нанесеними на ньому: назви заводу-виробника, найменування пробіотичного препарату, складом препарату та вагою одного пакетика-саше з пробіотичним препаратом. Планується виробляти пакетики-саше масою 0,5 г (містять 1 дозу препарату, для дітей) та масою 2,5 г (містять 5 доз препарату, для дорослих).

ПВМ 12.2. Маркування пакетиків-саше.

На пакетики-саше, які містять пробіотичний препарат, за допомогою лазера наноситься номер серії, місяць та рік коли було виготовлено препарат та місяць і рік до якого можна використати даний препарат.

ПВМ 12.3. Фасування у вторинну упаковку.

Фасування пакетиків-саше у вторинну упаковку також здійснюється автоматично. Вторинна упаковка з картону надходить на виробництво з уже нанесеними на ньому основними надписами: назви заводу-виробника, найменування пробіотичного препарату, складом препарату та вагою одного пакетика-саше з пробіотичним препаратом і т.д. Процес фасування здійснюється шляхом вкладання 10 шт пакетиків-саше в одну картону

упаковку та інструкції щодо застосування. Інструкції надходять на виробництво від компанії-партнера, що займається друкарською діяльністю.

ПВМ 12.4. Фасування у ящики.

Отримані на етапі ПВМ 12.3 запаковані картонні упаковки, які містять 10 шт пакетиків-саше, потрапляють з основної частини пакувально-фасуваної машини (ПФМ-52) на розвантажувальну стрічку (дана стрічка є частиною пакульно-фасувальної машини), звідки персонал бере їх, та фасує в ящики, котрі потім додаткового обмотують плівковою стрічкою з клейовим покриттям. Далі запаковані ящики відправляються до складу виробництва.

ЗВ 13. Знешкодження відходів.

ЗВ 13.1. Знешкодження рідких відходів.

Знешкодження рідких відходів здійснюється за використання біологічної очистки – аеротенків. Аеротенк - це резервуар прямокутного перетину глибиною 3-6 м, виконаний з металу, монолітного або збірного залізобетону або пластмаси.

Перед подачею стічних вод для очищення до аеротенків необхідно довести їх pH до значення 6,5 – 7,5, для унеможливлення інактивації активного мулу, і як результат, недостатньої очистки. Цей процес буде здійснюватися за використання розчину гідроксиду натрію.

Використовуються аеротенки-витискувачі, у передню частину якого подаються вода й намул, а суміш виводиться в кінці. У таких аеротенках можна досягти високої глибини очищення, однак при залповому надходженні забруднюючих речовин, що зазвичай характерно для виробничих стоків, активний мул виявляється перевантаженим, втрачає свою активність, спухає і виноситься з вторинних відстійників. Але так як об’єми рідких відходів є порівняно невеликими ця загроза є малою.

Установка працює таким чином: стічну воду подають у первинний відстійник води, де виводяться збурені частинки забруднювальної речовини. Для покращання осаджування сюди подається частина надлишкового намулу. Після освітлення вода надходить до передаератора 2. Сюди ж

скеровують частину надлишкового намулу із вторинного відстійника, де стічні води попередньо аеруються повітрям протягом 15—20 хв. За необхідності у передаератор можна вводити нейтралізуючі добавки та живильні речовини.

Із передаератора стічна вода подається в аеротенк, через який циркулює й активний намул. Біохімічні процеси в аеротенку протікають у два етапи: адсорбція поверхнею активного намулу органічних речовин і мінералізація легкоокислювальних речовин при інтенсивному споживанні кисню; доокислення повільноокислювальних органічних речовин і регенерація активного намулу. На цьому етапі кисень споживається досить повільно.

Аеротенк поділяється на дві частини: регенератор (25 % від загального об'єму) й аеротенк, в якому відбувається основний процес очищення. Наявність регенератора дає можливість очищати більш концентровані стічні води і збільшити продуктивність агрегату.

Потім стічна вода з намулом надходить до вторинного відстійника, де намул відокремлюється від води. Більша частина намулу повертається до аеротенка, а його надлишок спрямовують у передаератор.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж етапів культивування періодично (кожні 2 год) з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю: визначення загальної кількості клітин і кількості живих клітин; для контролю pH культуральної рідини, а також для визначення концентрації вуглецю та азоту.

Також упродовж етапів процесу виділення та очищення біомаси *L.plantarum*, на стадії приготування захисного середовища та на стадії стабілізації біомаси за допомогою нього, відбирають пробу захисного середовища та напівпродукту для мікробіологічного контролю: визначення відсутності мікробіоти та визначення відсутності сторонньої мікрофлори відповідно. Також окремо здійснюють контроль готового препарату.

9.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 9.1

Карта контрольних точок виробництва пробіотичного препарату «Лактобактерин»

Номер контрольної точки та назва стадії	***Об'єкт контролю та показник, що визначається***	***Засоби та методи контролю***	***Періодичність перевірки та відбору проб***	***Нормативні значення показника***
1	***2***	***3***	***4***	***5***
Кх 1.2.1 *Приготування мийно-дезинфікуючого розчину «Санікон»*	**Розчин «Санікон»** Концентрація	Хімічний контроль	Концентрація розчину визначається після приготування, контроль $С_{адр}$	С = 0,2 %
Кх 1.2.2 *Приготування мийно-дезинфікуючого розчину «Vasept forte»*	**Розчин «Vasept forte»** Концентрація	Хімічний контроль	Концентрація розчину визначається після приготування, контроль $С_{адр}$	С = 0,5 %

Продовження таблиці 9.1

Км, Кх 1.3.1 *Генеральне прибирання*	**Підлога, стіна, обладнання** Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 800/см^2
Км, Кх 1.3.2 *Щоденне прибирання виробничих приміщень*	**Підлога, стіна, обладнання** Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 300/см^2
Кт 1.4.1 *Миття обладнання*	**Мийно-дезинфікуючий розчин, обладнання** Температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	t = 30^{o}C, τ = 20-30 хв
Кт 1.4.3 *Дезинфекція та ополіскування*	**Мийно-дезинфікуючий розчин, обладнання** Температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	t = 30^{o}C, τ = 30 хв
Кт 1.4.4 *Перевірка на герметичність обладнання ємнісного обладнання*	**Герметичність роботи обладнання** Час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	Р = 0,2 МПа, τ = 1 год
Кт 1.4.5 *Стерилізація обладнання ємнісного обладнання*	**Обладання** Температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник, термометр технічний	Тиск, температура визначається безперервно під час стерилізації	Р = 0,28 МПа, τ = 1 год, t = 125 – 130^{o}C
Кт, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 *Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті*	**Розчин соляної кислоти** Концентрація	Хімічний метод	Концентрація розчину визначається після приготування	С = 6 %

об'ємом 10 л, 100 л та ферментері об'ємом 1 м^3.				
Кт, 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 *Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації pH середовища в посівному апараті на 10 л, 100 л та ферментері об'ємом 1 м^3.*	**Розчин гідроксиду натрію** Температура, час, концентрація, відсутність стронньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіоло-гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, концентрація розчину визначається після приготування, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ = 40 хв, С=6 %, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.1 *Підготовка та стерилізація захисного середовища*	**Захисне середовище** Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, термометр технічний, мікроскоп	Тиск, температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112-115 °С, τ = 20-30 хв, Р=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.1, 5.2.1, 5.3.1, 5.4.1 *Стерилізація композиції А*	**Композиція А** Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло-гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 30 хв, Р=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.2, 5.2.2, 5.3.2, 5.4.2 *Приготування і стерилізація композиції Б*	**Композиція Б** Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло-гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.3 *Приготування і стерилізація композиції В*	**Композиція В** Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло-гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Км 6.1 *Підтримання колекційної культури*	**Колекційна культура *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627** Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої	Мікробіоло-гічний контроль	Мікробіоло-гічний контроль проводять кожні 3-4 місяці при пересіві культури	Відсутність сторонньої мікробіоти

	мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій			
Кт, Км 6.2 *Вирощування культури в колбах на качалках*	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 2 годин	t= 37 °С, τ= 24 год, періодичне перемішування, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 *Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л*	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 2 годин	t= 37 °С, τ= 24 год, ω = 40 об/хв (періодичне перемішування кожні 2 год), $Р_{надл.}$=0,03—0,04 МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 *Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 100 л*	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 2 годин	t= 37 °С, τ= 24 год, ω = 40 об/хв (періодичне перемішування кожні 2 год), $Р_{надл.}$=0,03—0,04 МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.1 *Виробниче культивування в ферментері об'ємом 1 м^3*	**Посівний матеріал**, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання	t= 37 °С, τ= 24 год, ω = 40 об/хв (періодичне перемішування кожні 2 год), $Р_{надл.}$=

	тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів		– кожні 2 годин	0,03—0,04 МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 8.1 *Сепарування культуральної рідини*	**Обладнання** Тривалість сепарування, частота обертання ротора, температура процесу	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр	Частота обертання, температура визначається безперервно під час стерилізації	τ = 30-40 хв, t = 4°С, n=6000 об/хв
Км, Кт 9.1 *Змішування захисного середовища з біомасою*	**Напівпродукт** Тривалість змішування, частота обертання мішалки, температура процесу, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час змішування біомаси та захисного середовища	τ = 20 хв, t = 35-40°С, n=200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт 10.1 *Заморожування препарату*	**Обладнання** Тривалість заморожування, температура заморожування	Годинник, термометр технічний	Температура контролюється і підтримується автоматично весь час заморожування	τ = 24 год, t = -60°С
Кт 10.2 *Сублімаційне сушіння*	**Обладнання** Тривалість сублімаційного сушіння, температура сушіння, тиск	Манометр, годинник, термометр технічний	Тиск, температура визначається безперервно під час сублімаційного сушіння	t= 32-34 °С, τ = 40 год, Р=26,6 МПа
Кт 11.1 *Подрібнення та просіювання ліофілізованого препарату*	**Ліофілізований препарат** Діаметр частинок	Сито	Діаметр частинок визначається після процесу подрібнення	d=0.3 мм
Кт 12.1 *Пакування препарату в пакетики-саше*	**Пакетик-саше** Вага одного пакетика	Ваги	Вага пакетика-саше визначається безперервно під час пакування препарату	m=0.5 г, m = 2.5 г
Кт 12.2 *Маркування пакетиків-саше*	**Пакетик-саше** Відповідність номеру серії та	Візуальний огляд	Маркування пакетика-саше визначається	Відповідність дати та номеру серії

Продовження таблиці 9.1

	дати нанесеної лазером		безперервно під час пакування препарату	
Кт 12.3 *Фасування у вторинну упаковку*	**Вторинна упаковка** Кількість пакетиків-саше в одній коробці	Візуальний огляд	Кількість пакетиків-саше визначається після процесу пакування препарату	10 шт пакетів-саше в одній коробці

9.2. Мікробіологічний контроль

Контроль мікробіологічний (мікроскопіювання). Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для отримання препарату до центру чистого знежиреного предметного скла, в асептичних умовах, стерильною бактеріальною петлею наносять краплю культуральної рідини (або напівфабрикату). Краплю, що містить клітини мікроорганізмів, за допомогою петлі розтирають по склу (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують при кімнатній температурі до повного випаровування вологи. Потім на сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійного масла та мікроскопіюють (об'єктив х90) [105].

Під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Lactobacillus plantarum*. Клітини даного мікроорганізму мають вигляд маленьких коротких паличок, які розташовані окремо, попарно або у вигляді стрептобацил (рис. 9.1).

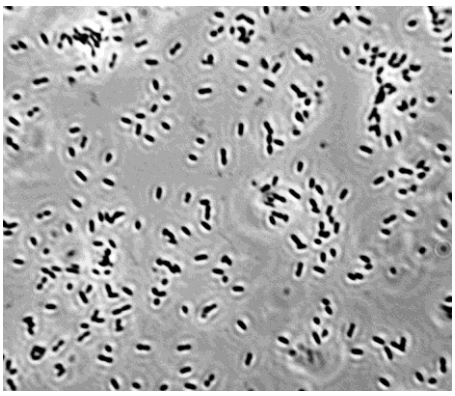


Рис. 9.1. Клітини *L. plantarum* під мікроскопом [106].

Контроль стерильності захисного середовища. Випробування на стерильність захисного середовища, після процесу стерилізації, здійснюють шляхом його висіву на середовище МПА і середовище Сабуро.

Для аналізу у асептичних умовах відбирають 1 мл захисного середовища, яке потім вносять у пробірку зі 9 мл стерильної води. Стерильною градуйованою піпеткою набирають 1,0 мл утвореної суспензії і виливають його в стерильні чашки Петрі. Після цього матеріал заливають 15–20 мл розтопленого й охолодженого до 45–50 °С МПА. Обережно похитуючи чашку, круговими рухами по поверхні стола перемішують у ній матеріал, досягаючи рівномірного розподілу в середовищі. Дослід здійснюють у трьох повторностях. Чашки залишають закритою до повного застигання агару, а потім перевертають догори дном. Посів на середовище Сабуро здійснють мікробіологічною петлею над полум'ям пальника. Петлею відбирають утворену суспензію, відкривають чашку Петрі над вогнем з одного боку і зигзагом (штрихом) проводять петлею по поверхні середовища. Дослід також здійснюють у трьох повторностях. Потім закривають чашки та перевертають догори дном.

Посіви на МПА витримують у термостаті за температури (38±1)^{o}С упродовж 48 год, на середовищі Сабуро – за (22±1)^{o}С протягом 72 год. Після інкубації посівів на протязі зазначених термінів на середовищах МПА та середовищі Сабуро не повинно спостерігатися жодного росту мікроорганізмів [7].

9.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.3.1. Концентрація цільового продукту (біомаси)

Визначення загальної кількості клітин. Після кожного відбору культуральної рідини з ферментера вимірюють оптичну густину отриманої клітинної маси при 600 нм за допомогою спектрофотометра. Концентрацію клітин визначають за допомогою калібрувального графіка.

У пробірки із 9 мл стерильної води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш перемішується, і потім вимірюється оптична густина [13].

Визначення кількості живих клітин. Життєздатні бактеріальні клітини визнають з використанням серійних розведень (метод Коха) і культивують в

агаризованому середовищі MRS. Кожен зразок культивується в чашках у двох повторностях при 37 °С протягом 48 год [13].

9.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецю. Для культивування *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 використовується поживне середовище MRS, джерелом вуглецю в якому є глюкоза.

Моносахариди, зокрема глюкозу, визначають за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (обладнання серії 1100, Agilent Technologies, Санта Клара, Каліфорнія). Суть методу полягає у аналізі суміші аліквотних кількостей культуральної рідини та сірчаної кислоти за допомогою Rezex RHM-моносахарид H^+ колони.

Для проведення визначення змішують аліквотні кількості 500 мкл культуральної рідини з 20 мкл 7% сірчаної кислоти, з наступним розбавленням зразків вдвічі дистильованою водою. Потім дану суміш центрифугують (13000×g; 10 хв; 20°С), фільтрували через шприцевий фільтр 0,45 мкм та аналізують на Rezex RHM-моносахарид H^+ колоні (8%), з елююванням 0,4 мл $хв^{-1}$ 0,5 ммоль сірчаної кислоти [107].

Визначення вмісту азоту. Для культивування *L. plantarum* 337Д УКМ В-2627 використовується поживне середовище MRS, основним джерелом азоту в якому є дріжджовий екстракт.

Вміст азоту в дріжджовому екстракті, і загального азоту в культуральній рідині, визначається за допомогою автоматичного обладнання Kjeltec™ 2400 [108]. Дане обладнання працює за принципом методу К'єльдаля. Дане обладнання використовується для складних зразків і для спеціальних аналізів з низькою концентрацією нітрогену.

Суть методу К'єльдаля полягає у тому, що у процесі визначення відбувається мінералізація випробуваного зразка під впливом концентрованої сірчаної кислоти при нагріванні в присутності каталізаторів. В якості каталізаторів можливе використання суміші калію сульфату. При цьому азот

перетворюється в амонію сульфат. При додаванні натрію гідроксиду виділяється аміак, який переганяють з парою в приймач, що містить кислоту для його поглинання: сірчану або хлористоводородную. Далі надлишок кислоти одтитровують розчином натрію гідроксиду. За результатами титрування розраховують вміст азоту [109]. Всі вище описані операції автоматично проводяться на обладнанні Kjeltec^{TM} 2400.

Для того, щоб розпочати дослідження достатньо помістити точно відміряні 10 мл культуральної рідини, яка попередньо була відібрана з ферментера та за домопогою центрифугування звільнена від клітин бактерій, в робочий циліндр аналізатора. Після встановлення циліндра, аналізатор автоматично розпочинає визначення вмісту азоту. Вимірювання здійснюється впродовж близько 30 хв, після чого результати виводяться на дисплей обладнання [110].

9.4. Методи контролю готового препарату «Лактобактерин»

Опис. Порошок (пориста або кристалічна маса) бежевого кольору різної інтенсивності або бежевого кольору із сіруватим відтінком зі специфічним запахом і смаком. Визначають візуально та органолептично.

Розчинність. У разі додавання води із розрахунку 1 см^3 на одну дозу препарату протягом 5 хв утворюється гомогенна завись сірувато-бежевого кольору. Визначають візуально.

Прозорість. Завись має бути непрозорою. Розчин готують за методикою з п. «Розчинність». Визначають візуально.

Кольоровість. Завись повинна мати бежевий або бежевий із сіруватим відтінком колір. Розчин готують за методикою з п. «Розчинність». Визначають візуально.

pH 5,5-6,5. Завись готують за методикою п. «Розчинність». Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.3, с. 17, потенціометрично.

Втрати в масі під час сушіння не більше ніж 3,5 %. Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.32, с. 49.

Суху розтерту біомасу із пакетика-саше у кількості 0,1 г сушать у вакуум-сушильній шафі за температури 58-62 °С і тиску від 1,5-2,5 кПа до постійної маси.

Специфічна нешкідливість. Препарат має бути нешкідливим для білих мишей за введення його перорально в кількості однієї дози.

Випробування проводять на п'яти безпородних мишах різної статі масою 14-16 г (зважують мишей безпосередньо перед дослідом).

Вміст флакону розводять водою з розрахунку 0,5 $см^3$ на одну дозу препарату. Кожній з п'яти мишей вводять 0,5 $см^3$ отриманої зависі перорально в шлунок за допомогою насадки на шприц місткістю 1 $см^3$. Термін спостереження - 5 діб.

Усі тварини мають залишитися живими і не втратити у масі.

У разі загибелі за цей період хоча б однієї тварини або втрати у масі контроль повторюють на подвійній кількості тварин. Препарат вважають нешкідливим, якщо при повторному випробуванні не загинуло жодної з мишей. У протилежному випадку цю серію препарату бракують.

Мікробіологічна чистота. Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та дріжджоподібних грибів.

Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с. 37, р. 2.6.13, N. с. 42.

Зразок лікарського засобу в кількості 10 г поміщають у мірний флакон місткістю 250 $см^3$, доводять до 100 $см^3$ (розведення 1:10) буферним розчином з хлоридом натрію і пептоном, pH 7,0 та перемішують до отримання гомогенної зависі.

Для визначення загальної кількості бактерій по 1 $см^3$ зависі висівають не менш як на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем № 1 методом двошарового висівання.

Для визначення загальної кількості грибів по 1 $см^3$ зависі висівають не менш ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем № 2 методом двошарового висівання.

Посіви на середовищі № 1 інкубують за температури 30-35 °С для виявлення бактерій, а посіви із середовищем № 2 - за температури 20-25 °С для виявлення грибів протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не буде отримано раніше.

Для визначення окремих видів мікроорганізмів по 10 $см^3$ зависі висівають на рідких поживних середовищах: № 3 (для виявлення бактерій родини *Enterobacteriaceae)* та № 8 (для виявлення *P. aureginosa* та *S. aureus)*. Посіви інкубують за температури 30-35 °С протягом 18-24 год, після чого роблять пересіви з середовища № 3 на густі середовища № 4 та № 5, аз середовища № 8 - на середовища № 9 та № 10. Посіви інкубують за температури 35-37 °С протягом 24-48 год. За наявності росту мікроорганізмів їх ідентифікують згідно з вимогами ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с. 42.

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджоподібних грибів. У разі виявлення в посівах сторонніх мікроорганізмів контроль проводять на подвоєній кількості зразків препарату. За відсутності росту мікроорганізмів у разі повторного висіву досліджуваний препарат вважають таким, що відповідає вимогам. Якщо сторонні мікроорганізми ростуть за повторного висіву зразків, то серію препарату бракують.

Визначення кількості живих лактобактерій в одній дозі препарату. Кількість живих лактобактерій в одній дозі препарату визначають на трьох зразках препарату від кожної серії.

Цю кількість лактобактерій в одній дозі препарату перевіряють паралельно з робочим стандартним зразком (РСЗ) Лактобактерину. Робочий стандартний зразок Лактобактерину – суха завись лактобактерій *L.plantarum* у флаконах, яка містить 10^9 живих мікробних клітин в одній дозі. Зберігати за температури мінус (18±2) °*С.*

Вміст пакетика-саше та РСЗ розводять водою *Р* з розрахунку 1 $см^3$ на одну дозу та залишають на 1 год за кімнатної температури для регідратації біомаси. Отримані мікробні суспензії препарату та РСЗ по 1 $см^3$ переносять у

пробірки, що містять по 9 $см^3$ середовища MRS та перемішують 12-15-кратним прокачуванням, отримуючи при цьому одну дозу лактобактерій в об'ємі 10 $см^3$ середовища (розведення 10^{-1}). Із цих пробірок роблять послідовні десятикратні розведення до 10^{-10}. Пробірки з розведеннями досліджуваних зразків препарату та РСЗ у поживних середовищах поміщають у термостат за температури (38±1) °С та інкубують протягом 4 діб.

Після закінчення інкубації відмічають розведення, в яких є ріст колоній лактобактерій у вигляді «цвяхів», «крихток», «ниток».

Кількість живих лактобактерій N в одній дозі визначають за формулою:

$$N = n \cdot 10^{m-1}$$

де *n* - кількість колоній в одній пробірці; *m* - величина розведення мікробної суспензії.

Насамперед ураховують результат у ряду розтитровування РСЗ. Якщо ріст бактерій спостерігається в розведенні не менш ніж 10^{-10}, то це свідчить про задовільні ростові властивості поживного середовища та достовірність результатів аналізу. Якщо в ряду розведень РСЗ ріст спостерігається в розведенні, меншому ніж 10^{10}, то дослід потрібно повторити на іншій серії поживного середовища.

Препарат вважають придатним, якщо ріст лактобактерій у ряді десятикратних розведень досліджуваного препарату становить не менше, ніж у пробірці з розведенням (10^{-10}), що відповідає вмісту 10^9 КУО живих мікробних клітин у в одній дозі. Якщо вміст живих мікробних клітин в одній дозі досліджуваного препарату менший за 10^9 КУО, а в 1 $см^3$ РСЗ -10^9 КУО, то контроль слід повторити на подвоєній кількості зразків.

Якщо за повторного контролю показники РСЗ відповідають висунутим вимогам, а показники досліджуваного препарату нижчі, то серію препарату бракують.

Визначення активності кислотоутворення препарату. Активність кислотоутворення препарату визначають титрометричним методом при

вирощуванні лактобактерій, що містяться у пакетику-саше на середовищі MRS.

У кожному досліді враховують показники із двох зразків препарату. До біомаси, ліофілізованої у пакетику-саше, додають середовище MRS із розрахунку 1 $см^3$ на одну дозу препарату.

Із двох зразків розведеного таким чином препарату переносять по 2,5 $см^3$ мікробної завісі в пробірки (d = 2 см, h = 20 см) з 25 $см^3$ середовища MRS і витримують протягом (72±1) год за температури (38±1) °С. Після цього визначають кислотність у кожній пробірці.

Отриману суспензію у кількості 10 $см^3$ вносять у хімічну склянку місткістю 50 $см^3$ і титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до pH (8,5±0,5). Показник pH контролюють потенціометрично.

Кислотність у градусах Тернера визначають за формулою:

$$^{o}T=VK\cdot 10,$$

де *V*- об'єм 0,1 М гідроксиду натрію, використаний на титрування, мм; *К*-коефіцієнт поправки до титру 0,1 М розчину гідроксиду натрію.

Середнє значення активності кислотоутворення, отримане для двох зразків, має бути не нижче ніж 90 °Т.

У разі отримання в одному із зразків показників кислотності нижче ніж 90 °Т дослід повторюють.

Якщо при повторному дослідженні результат незадовільний, то серію препарату бракують [111].

Герметичність пакетиків-саше. Дане випробування препарату здійснюється за використання вакуумної камери (як правило, без води) для проведення випробування на цілісність ущільнення пакетика-саше. Пробу поміщають всередину вакуумної камери, створюють вакуум, а те, як пакетик-саше себе поведе визначає результати тесту.

Випробування проводять наступним чином: поміщають зразок у вакуумну камеру, закривають кришку та створюють вакуум. При збільшенні вакууму пакетик-саше розширюється або роздувається. Після досягнення

бажаного рівня вакууму закривають вакуумний клапан і утримують вакуум протягом певного часу. Під час фази утримання досліджуваний зразок залишатиметься надутим. Після фази утримування відкривають вентиляційний клапан і починають зменшувати вакуум. У міру зменшення вакууму пакетик-саше почне зменшуватись і повертатися до початкової форми. В даному випадку пакетик-саше вважається герметичним.

Якщо під час збільшення вакууму саше не розширюється і ніяких змін розміру не спостерігається, даний зразок вважається негерметичним [112].

Рис. 9.2. Проведення випробування на герметичність пакетиків-саше [112]

РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

10.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації

Нормальна мікрофлора організму людини вивчається науковцями вже давно, проте донедавна її роль в організмі людини була недостатньо відома.

У здорової людини представники нормальної мікрофлори та організм знаходяться у стані еубіозу – динамічної рівноваги. Цей стан може порушуватися під дією різних факторів: вплив навколишнього середовища, стресові переживання людини, широке та безконтрольне вживання антибактеріальних засобів, променева терапія тощо. Як результат дії подібних факторів – порушується колонізаційна резистентність. В результаті втрати нормальною мікрофлорою своїх функцій розвивається дисбактеріоз. Дисбактеріоз провокує імунні порушення, розлади процесу обміну речовин і може проявлятися певною симптоматикою.

Препарати, які надають бактеріотерапевтичну та бактеріопрофілактичну дію на мікробіоту при захворюваннях шлунково-кишкового тракту відносяться до групи пробіотиків. Пробіотики – це живі мікроорганізми та речовини мікробного (або іншого) походження, які при введенні в організм природним шляхом та в дозволеній кількості чинять позитивний ефект на організм господаря. Найчастіше в ролі пробіотиків використовують штами лактобактерій та біфідобактерій [58].

Зважаючи на те, що клітини бактерій у пробіотичних препаратах повинні бути живими, одним із головних питань, що стосуються рецептури пробіотиків, є втрата їх життєздатності після сушіння та під час зберігання. Наявність достатньої кількості життєздатних мікроорганізмів у складі пробіотичних препаратів вважається істотним критерієм їх якості. Для підвищення тривалої стійкості пробіотиків важливо зберегти їх у сухому

вигляді зі зниженим рівнем вологи. Для сушіння пробіотиків можна виділити кілька методів, включаючи розпилювальну сушку, ліофільну сушку та вакуумну сушку [58].

Сублімаційна сушка, також відома як ліофілізація, є найбільш зручним і широко застосовуваним способом видалення води для підвищення стабільності зберігання пробіотиків [58]. Порівняно з іншими методами сушіння, такими як розпилювальна сушка, є дорогим процесом через порівняно високі витрати на інвестиції, експлуатацію та обслуговування, але процес ліофільної сушки дає багато переваг у результатах, отриманих з точки зору життєздатності, якості та часу зберігання пробіотичних культур. Ліофільна сушка також має переваги з точки зору характеристик кінцевого продукту, таких як стабільність у його складі, неушкодженість поживних речовин, зниження хімічної деградації, контроль кінцевої вологості та зменшення вмісту води в кінці процесу до дуже низьких рівнів. Сушка ліофілізацією - це процес, коли вода або інший розчинник заморожуються з подальшим її вилученням із зразка на завершальних стадіях ліофілізації. Цей процес передбачає використання сублімаційної сушарки (*рис.10.1*) і поєднує в собі три етапи: (1) зразок заморожується при низькій температурі, (2) первинна сушка відбувається, коли лід сублімується під зниженим тиском, і (3) вторинна сушка відбувається як етап десорбції, де видаляється залишкова волога або її зниження до низького рівня [113].

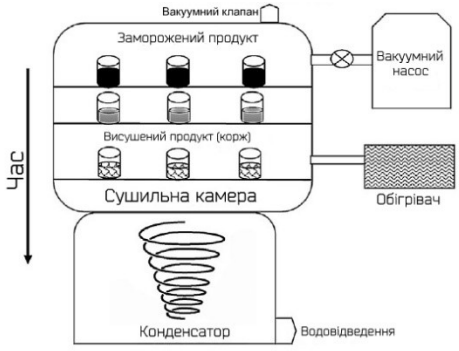


Рис. 10.1. Схематичне зображення сублімаційної сушарки [113]

Перед етапом сушіння необхідним є стабілізація біомаси молочнокислих бактерій шляхом додавання до неї захисного середовища. Ця операція

здійснюється з метою попередження втрат життєздатних клітин молочнокислих бактерій під час процесу ліофілізації.

Отже, процес сушіння, що передбачає використання сублімаційної сушарки включає наступні етапи:

1) біомасу, що була отримана на етапі відділення її від культуральної рідини, необхідно перемішати із захисним середовищем у співвідношенні 2:1 (культуральна рідина/захисне середовище), для уникнення пошкодження клітин і втрати ними життєздатності;

2) утворений напівфабрикат необхідно розлити в стерильні лотки та встановити у сублімаційну сушарку;

3) проходить процес заморожування напівфабрикату;

4) далі у процесі створюють низький тиск, а також поступово підвищують температуру, тобто розпочинається безпосередньо сушіння.

В результаті аналізу технологічного процесу встановлено, що автоматизація даної виробничої ділянки, а саме змішування біомаси з захисним середовищем з наступним сублімаційним висушуванням утвореного напівфабрикату, повинна забезпечувати:

1. Контроль і регулювання інтенсивності перемішування (кількість обертів мішалки за хвилину) з реєстрацією даних і сигналізацією при досягненні заданого значення та відхилення від нього;

2. Контроль за рівнем рідини у реакторі-змішувачі з сигналізацією досягнення заданого значення;

3. Контроль і регулювання температури заморожування у сушарці з реєстрацією даних і сигналізацією при досягненні заданого значення та відхилення від нього;

4. Контроль і регулювання температури сушіння у сушарці з реєстрацією даних і сигналізацією при досягненні заданого значення та відхилення від нього;

5. Контроль і регулювання тиску у сушарці з реєстрацією даних і сигналізацією при досягненні заданого значення та відхилення від нього.

10.2. Завдання на розробку схеми автоматизації

Завдання на розробку схеми автоматизації ділянки сублімаційного сушіння наведено у *табл. 10.1*

Таблиця 10.1

Завдання на розробку схеми автоматизації

№	Машина, апарат	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю
1	Реактор-змішувач із захисним середовищем	Інтенсивність перемішування	100-200 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів мішалки за хвилину і кнопка «Стоп» по місцю
2		Рівень рідини в апараті	(50±5) %	Контроль	Відображення, сигналізація	АРМ оператора
3	Сублімацій на сушарка	Температура заморожування	-60 ºС	Контроль	Відображення, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на подачу холодоагента
4		Температура сушіння	32-34 ºС	Контроль	Відображення, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на нагрівальний елемент
5		Тиск (вакуум) в апараті	26,6 Па	Контроль	Відображення, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на привід двигуна М2 і кнопка «Стоп» по місцю

10.3. Опис функціональної схеми автоматизації

На функціональній схемі автоматизації передбачено наступні контури.

У *контурі 3* здійснюється контроль рівня рідини у реакторі-змішувачі, який повинен знаходитись в межах значення 50±5%. Рівень рідини у реакторі-змішувачі вимірюється датчиком рівня (поз. 3а). Сигнал від датчика прибуває на контролер і в залежності від рівня рідини йде управління:

1) подачею біомаси (*контур 1*) виконавчим органом (поз. 1б), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 1а;

2) подачею стерильного захисного середовища (*контур 2*) виконавчим органом (поз. 2б), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 2а.

На АРМі оператора-технолога передбачається сигналізація про досягнення рівня.

У *контурі 4* здійснюється контроль та регулювання перемішування компонентів за допомогою мішалки, яка приводиться в дію мотором (М1). Частота обертів мотора мішалки регулюється виконавчим механізмом (поз. 4а). На АРМі оператора-технолога відбувається спостереження за зміною частоти обертів з наступним збереженням цих даних у архіві. Також на АРМі оператора-технолога передбачається сигналізація про відхилення, пуск та зупинку мотора. Наявна аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB1).

У *контурі 5* здійснюється подача утвореного напівфабрикату з реактора-змішувача в піддони від сублімаційної сушарки, за допомогою управління виконавчим органом (поз. 5б), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 5а.

У контурі 6 відбувається контроль та регулювання температури в сублімаційній сушарці, яка має регламентоване значення: для замрожування – -60 ºС; для сушіння – 32-34 ºС. Виміри температури здійснюються за

допомогою датчика (поз. 6а). Сигнал від датчика надходить на контролер і в залежності від необхідної температури здійснюється регулювання:

1) подачею холодоагента регулюючим органом (поз. 6д), при заморожуванні напівфабрикату;

2) нагрівального елемента регулюючим органом (поз. 6в), при підігріві напівфабрикату.

Управління виконавчими органами вказаними вище приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 6б.

На АРМі оператора-технолога здійснюється спостереження за зміною температури з наступним збереженням цих даних у архіві. Наявна аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB2).

Схема автоматизації ділянки сублімаційного сушіння наведена в *графічній частині*.

Специфікація засобів автоматизації наведена у *табл. 10.2*

Таблиця 10.2

Специфікація засобів автоматизації

№ п/п	№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, марка	Одиниця вимірювання	К-ть	Примітка
1	2	3	4	5	6	7
1	1а, 2а, 5а, 6б, 6г	Пневмоелектричний перетворювач (датчик) тиску. Вхідний сигнал 4…20 мА. Вихідний сигнал 20…100 кПа. Основна похибка 0,16% [114]	Aplisens PC-28G	Шт.	5	Aplisens
2	1б, 2б, 5б, 6в, 6д	Клапан регулюючий з пневмоприводом. Керуючий сигнал 20…100 кПа [115]	PV16G	Шт.	5	ООО «Астима»
3	3а	Магнітностракційний поплавковий датчик рівня. Матеріал з якого виготовлений: нержавіюча сталь. Діапазон вимірювань 300-4000 мм. Максимальна допустима температура +70^{o}С. Вихідний	NMT	Шт.	1	KOBOLD Messring GmbH

		сигнал 4…20 мА [116]				
4	6а	Датчик термоперетворювач опору. Діапазон від -50 до 150 ºС. Вихідний сигнал 4…20 мА [117]	ТСМ-1187	Шт.	1	ТОВ НВФ «Стандарт-М»
5	7а	Датчики тиску призначений для безперервного перетворення тиску в уніфікований вихідний сигнал постійного струму 4…20 мА. Допустима похибка від 0.1 % до 0.15 %. Діапазон вимірювань тиску: від 0 до 25 МПа (на замовлення). Живлення від 12 до 36 В + HART [118]	DSP–01	Шт.	1	ТОВ НВП «ГРЕМПІС»
6	SB1, SB2	Кнопка "Пуск-Стоп". Номінальна робоча напруга 48/120/230/400/660 В [119]	АРВВ-22N	Шт.	2	ГП «ІЕК»
7	4а, 7б	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт. Вхідна напруга 230 В. Вихідний струм 4,7 А [120]	ACS150	Шт.	1	ABB (Швеція)

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пробіотики і їх інноваційна інтерпретація (частина перша, загальна інформація) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://patent.km.ua/ukr/articles/i1557
2. *Рудіченко В.М., Одинець М.О., Тодорашко І.І., Черватюк В.В*. Кишечна мікрофлора: вплив на неї пробіотиків та пребіотиків // Фармакотерапія. – 2014. – Т. 185, №9. – С.32-35.
3. *Уманець Т.Р.* Сучасний погляд на імуномодулюючу дію пробіотиків // Новости медицины и фармации. – 2016. – т. 567, № 4. – С. 16-18.
4. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&atscode=A07FA
5. *Янковский Д. С., Моисеенко Р. А., Дымент Г. С.* Особенности отечественных мультипробиотиков // Современная педиатрия. - 2009. -№ 3 т. 25. - С. 79 – 86.
6. *Anandharaj M., Rani R. P., Swain M. R.* Production of High-Quality Probiotics by Fermentation. Microbial Functional Foods and Nutraceuticals. – 2017. – P. 235–266.
7. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2012. – 318 с.
8. *Гармашева І.Л., Коваленко Н.К., Підгорський В.С. та ін.* Взаємодія клітин штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 з глинистими мінералами *in vitro* // Мікробіол. журн. – 2016. – Т. 78, № 4. – С. 11-24.
9. Лактобактерин-Біофарма (Lactobacterin-Biopharma) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://compendium.com.ua/dec/264588/
10. *Лях В. Р., Червецова В. Г., Кричковська А. М.* Пробіотики як сучасні превентивні препарати захворюваньшлунково-кишкового тракту // CTAS. – 2018. – Вип. 1, № 1. – С. 72-77.

11. *Kim S., Huang E., Park S., Holzapfel W., Lim SD*. Physiological Characteristics and Anti-obesity Effect of *Lactobacillus plantarum* K10 // Korean J Food Sci Anim Resour. – 2018. – Vol. 38, N3. – P. 554-569.
12. *García A., Navarro K., Sanhueza E. et al.* Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-Helicobacter pylori activity // Electr. J. of Biotech. – 2017. – Vol. 25. – P. 75-83.
13. *Noori F., Tajabadi M., P.Jafari.* 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.
14. *Cummins J., Ho M.-W.* Genetically modified probiotics should be banned // Microbial Ecology in Health and Disease. – 2005. – N17. – P. 66-68.
15. *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.
16. *Lactobacillus plantarum* [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.tgw1916.net/Lactobacillus/plantarum.html
17. *Corsetti A., Ciarrocchi A., Prete R*. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum* // Reference Module in Food Science. – 2016. – P.1-8.
18. *Arasu M. V., Al-Dhabi N. A., Ilavenil S., Choi K. C., Srigopalram S*. In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2016. – Vol.23, N1. – P.6–10.
19. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: Учебно-методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с.
20. *Todorov S. D., Franco B. D. Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production // Food Reviews International. – 2010. – Vol. 26, N3. – P. 205–229.
21. Определитель бактерий Берги. – 9-е изд. / Пер. под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2. – 800 с.

22. *Хижняк О. С.* Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: Автореф. дис. … канд. фарм. наук. – Харків, 2016. – 195 с.
23. *Степанов Ю. М., Скирда І. Ю., Петішко О. П.* Хронічні запальні захворювання кишечника: особливості епідеміології в Україні // Гастроентерологія. - 2017. – т. 51, №2. – С.97-105.
24. *Рингач Н. О., Керецман А. О.* Хвороби органів травлення: історичні паралелі змін класифікації та епідеміологічної ситуації // Семейная медицина. – 2015. – т. 60, №4. – С. 137-141.
25. Життя по хвилинах: що потрібно знати про запальні захворюваннях кишечника? [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ua.interfax.com.ua/news/press-release/587596.html
26. *Жилка Н. Я., Миронюк І. С., Слабкий Г. О.* Характеристика деяких показників репродуктивного здоров'я жіночого населення України // Лікарські відомості. – 2018. – т. 71, №9. – С. 1803-1808.
27. *Скирда І. Ю., Петішко О. П. Завгородня Н. Ю.* Епідеміологічні особливості хвороб органів травлення в дітей та підлітків в Україні // Гастроентерологія. - 2017. – т. 51, №4. – С.97-105.
28. *Щудро С. А.* Захворюваність дітей в Україні: підходити до аналізу та прогнозування // Соціальна медицина. – 2016. – т. 21, №4. – С. 157-163.
29. Компендіум [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://compendium.com.ua/uk/
30. Лацідофіл (Lacidofil) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://compendium.com.ua/dec/265981/
31. Лінекс Форте® (Linex Forte) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://compendium.com.ua/dec/260334/
32. Лактобактерин сухой (Lactobacterin siccum). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_5813.htm

33. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Мутафлор» [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[11952]
34. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Лінекс бебі» [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[12945]
35. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Ентерожерміна» [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[21634]
36. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Лактовіт Форте» [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[28378]
37. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Ентерол 250» [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://likicontrol.com.ua/інструкція/?[23008]
38. KEGG [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.genome.jp
39. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632.
40. *Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В Е*. Обладнання мікробіологічних виробництв – М.: Агропромиздат, 1987. – 398с.
41. Промышленный ферментер BIORUS 1000 L [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bio-rus.ru/primeryi-speczifikaczij/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarii.html
42. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502
43. *Карлаш Ю.В.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної

та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В. Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.

44. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/Відкриті%20дані/2020_реєстр%20дезсасобів%201-351.pdf
45. Інструкція з використання дезінфікуючого засобу «VASEPT forte» [Електронний ресурс]. Режим доступу: file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/Інструкція%20з%20використання%20VASEPT%20forte%20(2).pdf
46. Дезекон [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://uk.interdez.com.ua/product/dezekon-unvcpd
47. Виндез ЧАС-С 1л Дезинфекция поверхностей и ИМН [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p657394633-vindez-chas-dezinfektsiya.html
48. САНІКОН [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanikon-interdez-kiev
49. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
50. *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.
51. Флотация [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://medic.studio/biotehnologii/flotatsiya-70593.html
52. *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.
53. *Doran P. M.* Unit Operations. Bioprocess Engineering Principles. 2013. P. 445–595.

54. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
55. *Gueimonde M., Sánchez B.* Enhancing probiotic stability in industrial processes // Microb Ecol Health Dis. – 2012. – № 23. – P. 1-5.
56. *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.
57. *Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., & Kourkoutas Y.* Immobilization Technologies in Probiotic Food Production // J of Nutr and Metabol. – 2013. – P. 1 –15.
58. *Broeckx G., Vandenheuvel D., Claes IJ., Lebeer S., Kiekens F.* 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.
59. *Marcial-Coba MS., Knøchel S., Nielsen DS.* Low-moisture food matrices as probiotic carriers // FEMS Microbiol Lett. – 2019. – Vol. 366, № 2.
60. *Jantzen, M., Göpel, A., Beermann, C.* Direct spray drying and microencapsulation of probiotic Lactobacillus reuteri from slurry fermentation with whey // J. Appl. Microbiol. – 2013. - № 115. P. 1029–1036.
61. *Golman B., Julklang W.* Analysis of drying kinetics of a slurry droplet in the falling rate period of spray drying // Int. J. Chem. Sci. Eng. – 2013. - № 7. – P. 344 –348.
62. *Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P.* Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes // J. Appl. Microbiol. – 2008. – № 105. P. 1–13.
63. *Fowler A., Toner M.* Cryo-injury and biopreservation // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2005. – № 1066. – P. 119–135.
64. Producing quality probiotics is an art and science [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.lallemandanimalnutrition.com/wp-content/uploads/2012/08/AquaCultureProbiotics_AsiaPacific_2012.pdf

65. Щокова дробарка [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ulbm.in.ua/ua/wiki/shchokova-drobarka
66. Обґрунтування та визначення раціональних параметрів гідравлічної дробарки, що застосовується на збагачувальних фабриках [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://masters.donntu.org/2014/fimm/simonenko/diss/indexu.htm#p32
67. *Fenster K., Freeburg B., Hollard C., Wong C., et al.* The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach // Microorganisms.- 2019. – Vol. 7, №3.
68. Glass as a packaging material in pharmaceutical packaging [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.slideshare.net/shwetashelke35/glass-as-a-packaging-material-in-pharmaceutical-packaging-71496789
69. *Fiorentini Â. M., Ballus C. A., Oliveira M. L. de, Cunha M. F., & Klajn, V. M.* The influence of different combinations of probiotic bacteria and fermentation temperatures on the microbiological and physicochemical characteristics of fermented lactic beverages containing soybean hydrosoluble extract during refrigerated storage // Ciência e Tecnologia de Alimentos. – 2011. - Vol. 31, N 3. – P. 597–607.
70. Probiotics consumers demand very particular types of packaging [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.comar.com/news-room/probiotics-consumers-demand-very-particular-types-of-packaging/
71. *Guergoletto K., Sivieri K., Tsuruda A., Martins E., de Souza J., Roig M., Hirooka E. and Garcia S.* Food Industrial Processes – Methods and Equipment. Dried Probiotics for use in functional food applications // Benjamin Valdez (ed.), InTech, Shanghai, China. – 2012. – P. 227-235.
72. *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.
73. Bacteria freeze drying protocol. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpbacteriafdprotocol.htm

74. *Golowczyc MA, Silva J, Abraham AG, et al.* Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying // Lett Appl Microbiol. – 2010. – Vol. 50, № 1. – P. 7-12.
75. *Savedboworn W., Kerdwan N., Sakorn A., Charoen R., Tipkanon S. and Pattayakorn K.* 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.
76. *Jalali M., Abedi D., Varshosaz J., Najjarzadeh M., Mirlohi M., Tavakoli N.* 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.
77. Электронный промышленный дозатор воды и жидкостей Serv_W21 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p491625353-elektronnyj-promyshlennyj-dozator.html
78. Мерник технический [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p873581768-mernik-tehnicheskij-500l.html
79. Реактор 250 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://promvit.com.ua/reaktor-250-l/
80. Реактор эмалированный, 400 литров, 630 литров, реактор из нержавеющей стали 0,63м3 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p6490813-reaktor-emalirovannyj-400.html
81. Весовой дозатор для сыпучих продуктов VD1-V8 (0,2-40 kg) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p412586071-vesovoj-dozator-dlya.html
82. Фильтр Д аэрозольный [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://ukrvent.ua/filtr_d.html
83. Реактор 10 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://odessa.flagma.ua/reaktor-nerzhaveyushchiy-reaktor-nerzhaveyka-vse-o8271223.html

84. Вихревые насосы DAB KPS, DAB KPF, DAB KP [Електронний ресурс].Режим доступу: http://www.dabpump.com.ua/tsentrobezhnye-nasosy/90-dab-kps-dab-kpf-dab-kp.html
85. Приточная установка Systemair TLP 200/5.0 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bioclimat.com.ua/p549549991-pritochnaya-ustanovka-systemair.html
86. Ostberg TKS 300 A [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bioclimat.com.ua/p549549035-ostberg-tks-300.html
87. Карманный фильтр ФЯК F9 592x490x600-8 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://asfilter.com.ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyy-filtr-592kh490kh600-8-f9/
88. Охладитель воздуха Salda AVA 200 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://vencon.ua/products/kruglyj-vodyanoj-ohladitel-salda-ava-200
89. Водяной нагреватель НКВ 125-2 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p531045258-vodyanoj-nagrevatel-nkv.html?prosale=&utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=pla_stroitelstvo&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQjwpfHzBRCiARIsAHHzyZoQOlZBLFNMtlnz8UgYz176kE_Kax6PNaASC-T7oOCoCKoPm5aW9uIaAkrHEALw_wcB
90. HEPA Filters [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://volzfilters.com/wp-content/uploads/2019/11/20180821_Delivery-Program_A4_English.pdf
91. Реакторы JUCHHEIM cocoon — прочность как у стали, коррозионная стойкость как у стекла [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.millab.ru/about/news/production_news/view/391-reaktory-juchheim-cocoon-prochnost-kak-u-stali-korrozionnaya-stoykost-kak-u-stekla/
92. BIOSTAT D-DCU [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.sartogosm.ru/biostat_d50_d100.html

93. Центробежный насос CM004/PP с магнитной муфтой [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom-nasos.pro/catalog/primery_primeneniya_promyshlennykh_nasosov/
94. Мобильный реактор объемом 30л [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://promvit.com.ua/mobilnyj-reaktor-obemom-30l-iz-stali-304l-s-nagrevom-i-otkidnoj-kryshkoj/
95. Аппарат СЭРН-160 литров, Реактор эмалированный 160 литров [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bigl.ua/p6490752-apparat-sern-160
96. Реактор объемом 20 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://promvit.com.ua/reaktor-obemom-20-l-2-e-telezhki-i-3-i-stola-iz-nzh-stali/
97. Промышленный ферментер BIORUS 1000 L [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bio-rus.ru/primeryi-speczifikaczij/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000-l-dlya-veterinarii.html
98. Small Scale Freeze Dryer FD 10 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://siccadania.dk/wp-content/uploads/2019/04/FD10.pdf
99. Lump breaker - roller crusher [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.jehmlich.info/en/content/precrushing/lump-breaker/index.html
100. Sigpack RA [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.syntegon.com/products/sigpack-ra?t=1592&tg=1586&vpa=&kp=&prod=1429&ind=186
101. Промышленный сепаратор для биотехнологии MBPX 810H [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://biotechno.ru/chem/promyshlennye-ceparatory/promyshlennyy-separator-dlya-biotekhnologii-mbpx-810h/
102. Реактор 250 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://promvit.com.ua/reaktor-250-l/
103. *Pancheniak Ede F, Maziero MT, Rodriguez-León JA, Parada JL, Spier MR, Soccol CR.* Molecular characterisation and biomass and metabolite production

of *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001: A potential probiotic // Braz J Microbiol. – 2012. – Vol.43, №1. – P.135-147.

104. *Broeckx G., Vandenheuvel D., Claes IJ., Lebeer S., Kiekens F.* 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.

105. *Шульга Н.М., Бовкун А.О., Млечко Л.А.*. Мікроскопіювання у санітарно-мікробіологічному контролі виробництва молочних продуктів. Навчальний посібник. - К.: ІПДО НУХТ, 2008. – 49 с.

106. Probióticos en la miel natural. Режим доступу: https://apiterapia58.webnode.es/l/probioticos-en-la-miel-natural/

107. *Plumed-Ferrer C., Koistinen Kaisa M., Tolone Tiina L. et al.* Comparative Study of Sugar Fermentation and Protein Expression Patterns of Two *Lactobacillus plantarum* Strains Grown in Three Different Media // Appl Environ Microbiol. – 2008. – Vol. 74, N17. – P. 5349–5358.

108. *Ooi1May Foong, Mazlan N., Foo1 Hooi Ling, et al*. Effects of carbon and nitrogen sources on bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4 // Malaysian Journal of Microbiology. – 2015. – Vol. 11, N2. – P. 176-184.

109. ОФС.1.2.3.0011.15 Определение азота в органических соединениях методом Къельдаля [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0011-15-opredelenie-azota-v-organicheskih-soedineniyah-metodom-keldalya/

110. Анализаторы азота Kjellec System моделей 1030, 2300, 2400, 8400, 8420, 8460. Руководство по эксплуатации.

111. Аналітично-нормативна документація на «Лактобактерин-Біофарма».

112. Dry and wet vacuum leak quality testing of sachets filled with powder or liquid [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.sanatron.com/articles/leak-testing-methods/dry-and-wet-vacuum-leak-quality-testing-of-sachets-filled-with-powder-or-liquid.php

113. *Conde-Islas A., Jiménez-Fernández M., Cantú-Lozano D., et al.* Effect of the Freeze-Drying Process on the Physicochemical and Microbiological Properties of Mexican Kefir Grains // Processes. – 2019. - №3, Vol. 7.
114. Пневмоелектричний перетворювач (датчик) тиску типу PC-28G [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://aplisens.com.ua/prod/33
115. Клапан регулирующий с пневмоприводом PV16G [Елекронний ресурс]. Режим доступу: http://asteama.ru/catalogues/control_valves/actuators_control_valves/ADCA_PV16G
116. Магнитострикционный уровнемер NMT [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.kobold.com/Магнитострикционный-уровнемер-NMT
117. Термоперетворювачі опору ТСП/М-1187 [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://standart-m.com.ua/kipia/termopreobrazovateli/termopreobrazovateli-soprotivleniya/termopreobrazovateli-soprotivleniya--tspm-1187/?mova=uk
118. Датчики тиску DSP–01 [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://grempis.com.ua/dsp/
119. Кнопка АРВВ-22N "Пуск-Стоп" d=22мм неон/240В 1з+1р IEK [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.iek.ru/products/catalog/oborudovanie_kommutatsionnoe_i_ustroystva_upravleniya/ustroystva_podachi_komand_i_signalov/knopki_pereklyuchateli_svetosignalnaya_armatura/knopki_upravleniya/knopka_apvv_22n_pusk_stop_d_22mm_neon_240v_1z_1r_iek
120. Частотный преобразователь ABB ACS150 0,75кВт [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://axiomplus.com.ua/chastotniki/product-71875/

УДК 579.6:57.042

І.Л. Гармашева[1], Н.К. Коваленко[1], В.С. Підгорський[1], О.П. Лівінська[1], С.І. Войчук[1], Л.Т. Олещенко[1], Т.В. Томила[2], Т.Ф. Лобунець[2]

[1]Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
[2]Інститут проблем матеріалознавства ім. М.І. Францевича НАН України, вул. Кржижановського, 3, Київ, 03680, Україна

ВЗАЄМОДІЯ КЛІТИН ШТАМУ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 337Д УКМ В-2627 З ГЛИНИСТИМИ МІНЕРАЛАМИ *IN VITRO*

Мета. *Охарактеризувати взаємодію клітин штаму Lactobacillus plantarum 337Д УКМ В-2627, що володіє пробіотичними властивостями, з каолінітом й монтморилонітом.* ***Методи.*** *Використано методи інфрачервоної спектроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії, адсорбційно-структурний статичний об'ємний метод, мікробіологічні та статистичні методи.* ***Результати.*** *При взаємодії клітин штаму L. plantarum 337Д з частинками глинистих мінералів характеристики пористого простору останніх практично не змінювались у порівнянні з вихідними зразками, розподіл пор за розмірами ставав ширшим за рахунок появи пор великого діаметру, зменшувалась питома поверхня, але сорбційна ємність та шарова будова глинистих мінералів зберігалась. Вперше встановлено вплив каолініту і монтморилоніту на ріст штаму L. plantarum 337Д in vitro. Найбільший стимулювальний вплив глинистих мінералів спостерігали на другій годині культивування. Питома швидкість росту штаму L. plantarum 337Д була у 5,2 рази більшою при культивуванні в середовищі MRS з 4 % каолініту та у 6 разів більшою – в середовищі MRS з 1 % монтморилоніту в порівнянні з контролем. Наявність у середовищі каолініту чи монтморилоніту уповільнювала процес зниження pH при культивуванні штаму L. plantarum 337Д порівняно з контролем. За наявності монтморилоніту pH середовища знижувався повільніше, ніж у присутності каолініту. Різниця між значенням pH середовища з 4 % каолініту на початку культивування і через дві години (ΔpH) була в 10 разів меншою в порівнянні з контролем. У той же час pH середовищ з 1 % і 4 % монтморилоніту починав знижуватись через 4 години культивування.* ***Висновки.*** *Різний вплив на ріст штаму L. plantarum 337Д обумовлений відмінностями фізико-хімічних характеристик каолініту і монтморилоніту, використаних у роботі.*

К л ю ч о в і с л о в а: молочнокислі бактерії, алюмосилікати, каолініт, монтморилоніт.

Взаємодія мікроорганізмів і глинистих мінералів здавна привертає увагу багатьох дослідників. Оскільки глинисті мінерали входять до складу ґрунтів і відіграють важливу роль як у функціонуванні, так і в розповсюдженні мікробіоти ґрунтів, найбільша кількість робіт присвячена вивченню їх взаємодії з грунтовими бактеріями. Було показано, що глинисті мінерали стимулюють ростову активність штамів *Bradyrhizobium japonicum* [7] і *Azotobacter vinelandii* [9]. Каолініт і монтморилоніт стимулюють процес дихання бактерій видів *Agrobacterium radiobacte, Escherichia coli, Pseudomonas striata, P. aeruginosa,* крім того вони можуть бути джерелом

© І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко, В.С. Підгорський, О.П. Лівінська, С.І. Войчук, Л.Т. Олещенко, Т.В. Томила, Т.Ф. Лобунець, 2016

мінералів [21]. Відмічено, що алюмосилікати можуть відрізнятися за дією на різні штами *B. japonicum* [7]. Сили, що беруть участь в адсорбції бактерій на мінералах, виникають внаслідок електростатичних (кулонівських) сил [16, 19].

Алюмосилікатні глини здавна використовуються як ентеросорбенти в медицині та ветеринарії. Найбільш відомі комерційні препарати «Каопектат» і «Смекта», що містять у своєму складі каолініт і смектит відповідно, є ефективними антидіарейними засобами [14]. У тваринництві алюмосилікати застосовуються як харчові добавки до кормів для попередження мікотоксикозів у свійських тварин та птиці [18, 23]. Позитивний вплив глинистих мінералів на макроорганізм пов'язаний, у першу чергу, з їх сорбційними властивостями. Показано, що вживання монтморилоніту попереджало гіпертиреоїдизм у лабораторних тварин [10]; монтморилоніт адсорбує креатинін і посилює його екскрецію з кишечнику [26]. Каолініт та інші алюмосилікати ефективно зв'язують ендотоксини при кишкових захворюваннях [13].

Разом з цим, приділяється мало уваги впливу глинистих мінералів на кишкову мікробіоту. Було показано, що додавання глин у корм може впливати на склад мікрофлори кишечнику свійських тварин. Так, додавання монтморилоніту значно знижувало кількість *E.coli* і клостридій у кишечнику поросят [24, 25]. У той же час дані щодо впливу глинистих мінералів на представників нормальної мікробіоти обмежені і дещо суперечливі. Повідомлялось як про підвищення кількості біфідобактерій і лактобацил [26], так і про зниження кількості лактобацил [17] при вживанні з кормом глинистих мінералів, а також про відсутність впливу монтморилоніту на кількість представників *Lactobacillus, Enterobacteriaceae* і *Salmonella* у кишечнику поросят [22].

Отже, не дивлячись на кількість накопичених експериментальних даних щодо взаємодії бактерій і мінералів, фундаментальні механізми, що задіяні у цьому процесі, все ще не вивчені. У доступній літературі нами не знайдено наукових робіт, присвячених вивченню взаємодії частинок глинистих мінералів з клітинами молочнокислих бактерій (МКБ). Зважаючи на широко розповсюджене вживання глинистих мінералів як харчових добавок, вкрай важливим є дослідження їх впливу на представників нормальної мікрофлори кишечнику, зокрема на молочнокислі бактерії. Також цікавим є питання взаємодії глинистих мінералів з пробіотичними штамами МКБ, оскільки пробіотики, так само як і глинисті мінерали, застосовуються при різноманітних розладах шлунково-кишкового тракту.

Метою роботи було дослідження взаємодії клітин штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, який виявляє широкий спектр біологічної активності і має пробіотичні властивості, з частинками каолініту і монтморилоніту.

Матеріали і методи. У роботі використано штам *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (УКМ). Цей штам було виділено з шлунково-кишкового тракту людей-довгожителів у 1978–1981 роках під час міжнародної геронтологічної експедиції до високогірних селищ Абхазії – регіону з високим рівнем довголіття [4]; показана його висока біологічна активність [5].

Взаємодію бактерій з глинистими мінералами вивчали з використанням порошків каолініту (Кремневіттм, ЗАТ «АРТ-ПРОМБУД») і монтморилоніту. Бактерії вирощували на рідкому середовищі MRS [11] при температурі 37 °С, pH = 7, протягом 24 годин при 40 об/хв. Клітини осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 15 хв. Осад бактеріальних клітин двічі промивали дистильованою водою шляхом центрифугування при 5000 об/хв протягом 15 хв. До бактеріальної суспензії концентрацією 1×10^9 КУО/мл додавали до неї порошки каолініту чи монтморилоніту із розрахунку 20 мг/мл. Отримані суспензії центрифугували при 1000 об/хв протягом 15 хв, осад висушували під вакуумом при 70 °С.

Фазовий склад зразків глинистих мінералів досліджували методом рентгенівського фазового аналізу (РФА) за допомогою дифрактометру ДРОН-3. Розшифровку спектрів здійснювали за допомогою бібліотеки JCPDS-ICDD.

Вивчення гранулометричного складу проводили на лазерному гранулометрі «Наносайзер HS1000» з використанням 0,2 % дисперсій глинистих мінералів.

Дослідження пористої структури зразків проводили адсорбційно-структурним статичним об'ємним методом на приладі ASAP 2000M. Діапазон вимірювання даного методу знаходиться в інтервалі еквівалентних розмірів пор від 0,3 до 300 нм. Отримані ізотерми сорбції азоту на досліджених зразках розраховували згідно теорій BET (Brunauer S., Emmett P.H., Teller E.), BJH (Barrett E.P., Joyner L.S., Halenda P.P.) [2].

ІЧ-спектроскопічні дослідження проводили на Фур'є-спектрометрі ФСМ-1201 в області частот 4000–400 $см^{-1}$.

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили на електронному мікроскопі JEOL JEM 1400 (Японія) при напрузі 80 кВ.

Вплив порошків каолініту і монтморилоніту на ріст та кислотоутворення штаму *L. plantarum* 337Д досліджували в середовищах MRS з вмістом глинистих мінералів 1 %, 2 % і 4 %. Як контроль, використовували середовище MRS. Початкова концентрація бактеріальних клітин складала $3{,}0\pm0{,}5\times10_7$ КУО/мл. Інкубацію проводили в термостаті при 37 °С. Кожні 2 години відбирали проби для вимірювання pH і визначення кількості клітин. Питому швидкість росту визначали за формулою:

$$\mu = \frac{2{,}3(\lg x_2 - \lg x_1)}{t_2 - t_1}$$

де x_2 і x_1 – концентрації клітин мікроорганізмів в години t_2 і t_1, 2,3 – кое- фіцієнт переходу від натуральних логарифмів до десяткових [3].

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми «Statistika 7.0» (Stat Soft, Inc. США). Досліди проводили у трьох повторностях.

Результати. *Фізико-хімічні характеристики зразків глинистих мате-ріалів:*

За даними хімічного й спектрального аналізів основними елементами октаедрично-тетраедричної шарової структури каоліну є Si (20,7 %) і Al (18,95 %), а монтморилоніту – Al (59,0 %), Si (18,0 %), Fe (17 %). У зразках також присутні домішки інших елементів, таких як Mg, Ca, Ti, Mn.

Аналіз дифракційних картин глинистих матеріалів виявив наявність двох кристалічних фаз у кожному з них. Зокрема, в каоліні присутні кристалічні структури типу диккіт і галуазит, у порошку монтморилоніту – монтморилоніт і гетит.

Гранулометричний склад використаних глинистих мінералів наведено у таблиці 1. Більшість частинок каолініту мають розміри від 300 до 800 нм, тоді як монтморилоніт характеризується меншим розміром часток, що в основному не перевищував 500 нм.

Таблиця 1

Гранулометричний склад порошків глинистих мінералів

Зразок	Вміст частинок (%) різного розміру, нм					
	<100	100–300	300–500	500–800	800–1000	>1000
каолініт	0	2,1	45,9	34,1	17,8	0
монтморилоніт	0	29,2	58,6	12,2	0	0

Отримані ізотерми адсорбції азоту на досліджених об'єктах, наведені на рисунку 1, відносяться до IV типу ізотерм [2], а по типу петель гістерезису, згідно класифікації IUPAC – до типу H3 (рис. 1) [15]. Кожен тип петлі гістерезису ізотерм низькотемпературної адсорбції азоту пов'язаний з певною будовою пористої структури. Тип петель гістерезису H3 пов'язаний з будовою адсорбентів, які мають щілинні пори, або складаються з пласкопаралельних частинок. Таким чином, об'єкти досліджень являють собою мезопористі шаруваті структури з переважно щілинною моделлю пор. Гістерезис високого тиску свідчить про крупнопористу структуру зразків. Розрахунки отриманих ізотерм адсорбції азоту на досліджених зразках показали, що для каолініту значення питомої поверхні мезопор сягає 23,2 м^2/г, а середній їх розмір – 9,4 нм. Досліджений порошок монтморилоніту має питому поверхню 94,8 м^2/г, майже 50 % об'єму та поверхні мезопор належить порам вузького діапазону 3,6–4,1 нм (рис. 2). Слід зазначити, що монтморилоніт, завдяки такій поровій будові, здатний до набухання.

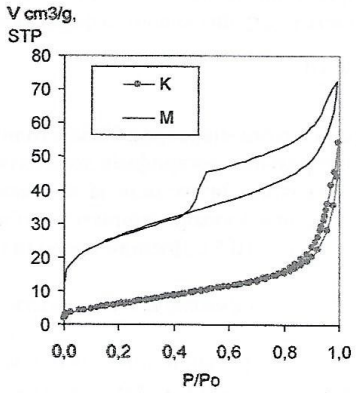


Рис. 1. Ізотерми сорбції азоту на зразках глинистих мінералів каолініт (К) та монтморилоніт (М)

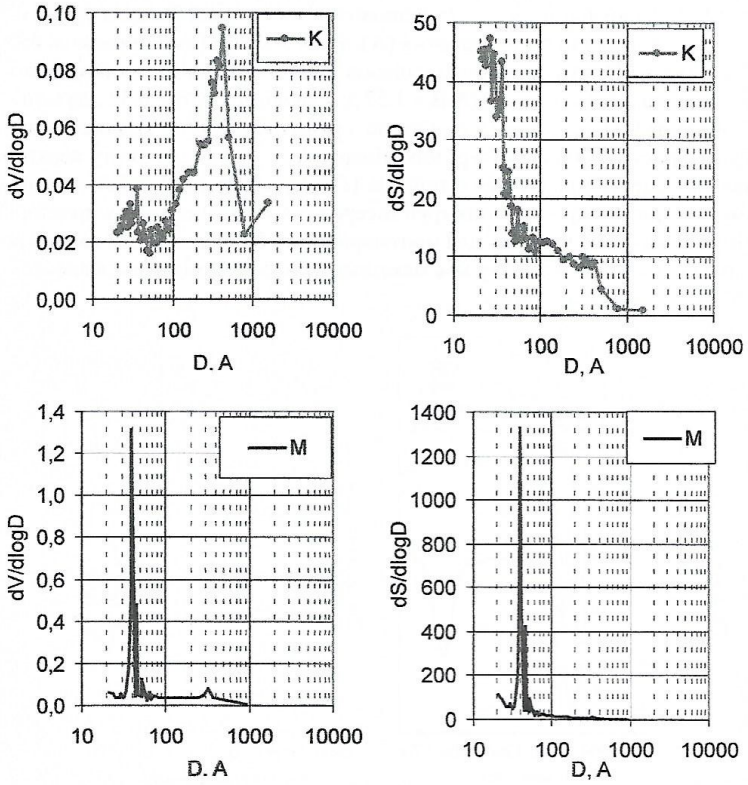


Рис. 2. Диференційні розподілення об'ємів та поверхні пор за розмірами у каолініті (К) та монтморилоніті (М)

ІЧ-спектри зразків використаних у роботі глинистих матеріалів наведені на рисунках 3 і 4. У досліджуваному діапазоні частот 4000–400 $см^{-1}$ виявляються смуги поглинання, характерні для валентних та деформаційних коливань зв'язків: Si – O, S – O– Al, OH, H – O – Al [8]. Шаруваті силікати виявляють одну інтенсивну смугу в області ν ~ 1003 $см^{-1}$ і слабкіші смуги в області ν ~ 1050 $см^{-1}$ і 925 $см^{-1}$. Спектр двошарового каолініту відрізняється від тришарового монтморилоніту зсувом смуги поглинання в області ν ~ 1003 $см^{-1}$ у довгохвильову сторону. Виражена широка смуга при ν ~ 1003 $см^{-1}$ відповідає валентним коливанням Si-O-Si тетраедрів кремнекисневого каркасу, а смуги в інтервалі частот ν ~ 600 – – 460 $см^{-1}$ – деформаційним коливанням зв'язків Me–O. Інтенсивна смуга в інтервалі n ~ 3700–3100 і смуга 1638 $см^{-1}$ відносяться до валентних і деформаційних коливань ОН-груп вільних та зв'язаних молекул води. Аналіз форми смуг ІЧ-поглинання показав, що для монтморилоніту характерні розширені смуги поглинання в діапазоні частот n ~ 950 – – 1200 $см^{-1}$ і зникнення тонкої структури смуг, котра є характерною для каолініту. Становить інтерес відмінність у поглинанні досліджених мінералів в області ν ~ 3690–3560 $см^{-1}$ (рис. 3, 4Б). Каолініт виявляє дві ОН–

смуги, які відрізняються по інтенсивності. Поглинання близько 3690 $см^{-1}$ (високочастотна смуга) позначають (А), а близько 3560 $см^{-1}$ (низькочастотна смуга) — (В). Аналіз співвідношення А/В для каолініту і монтморилоніту показав, що воно різне (А/В = 1,57 для каолініту, А/В = 0,52 для монтморилоніту). Це може бути пов'язано з різною кількістю гідроксильних груп у кристалічній структурі цих мінералів. У монтморилоніту верхній киснево-гідроксильний шар є лише на 1/3 гідроксильним і на 2/3 – кисневим. Більшість гідроксильних груп зосереджено в міжшаровому просторі. Тому і міжшарова відстань для монтморилоніту більша, ніж для каолініту. За рахунок слабкого зв'язку між пакетами, мінерал відрізняється високою ємністю катіонного обміну.

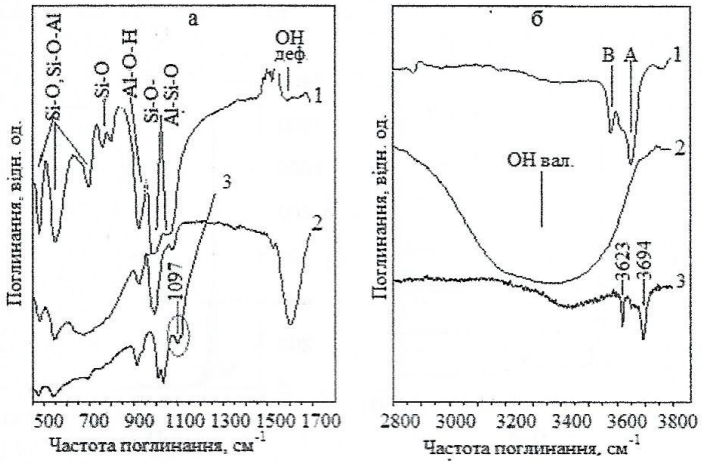


Рис. 3. Інфрачервоні спектри зразків каолініту і композиту на його основі
1 – каолініт; 2 – суспензія каолініту в дистильованій воді; 3 – суспензія каолініту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д

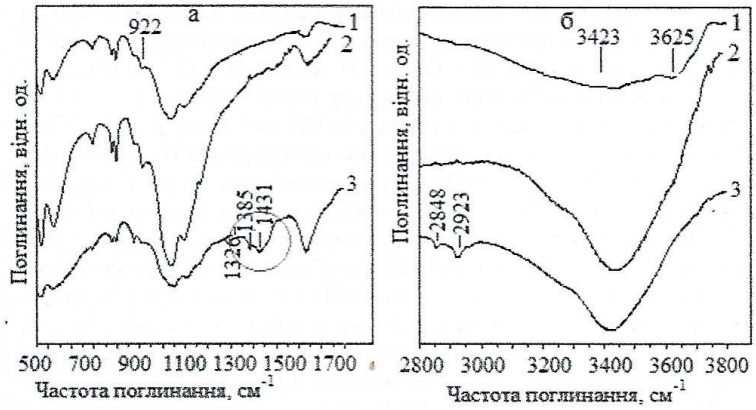


Рис. 4. ІЧ-спектри монтморилоніту і композиту на його основі
1 – монтморилоніт (вихідний зразок); 2 – монтморилоніт (після подрібнення); 3 – суспензія монтморилоніту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д

При приготуванні суспензії порошку каолініту в дистильованій воді спостерігається зміна вигляду ІЧ-спектру. В області коливань валентних гідроксильних груп відбувається злиття трьох смуг поглинання компонент (ν ~ 3690, 3560, 3423 $см^{-1}$) в одну широку інтенсивну смугу з частотою ν ~ 3374 $см^{-1}$ (характерну для валентних коливань ОН-груп молекул води), а смуга деформаційних ОН-коливань з частотою ν ~ 1638 $см^{-1}$ посилюється по інтенсивності. В ІЧ-спектрі водної суспензії спостерігаються також зміни в інтервалі ν ~ 900–1200 $см^{-1}$, що зводяться до розширення і злиття властивих йому смуг, з набуванням контурів, характерних для аморфної фази (рис. 4А).

Для ІЧ-спектрів поглинання суспензії частинок каолініту і бактеріальних клітин спостерігається зменшення інтенсивності усіх смуг поглинання і з'являється нова смуга з частотою ν ~ 1094 $см^{-1}$. Такі зміни можна пов'язати з процесом взаємодії клітин *L. plantarum* 337Д з поверхнею каолініту і утворенням композиту на його основі.

Для зразку, після подрібнення монтморилоніту, на ІЧ-спектрі спостерігається посилення всіх смуг поглинання, а також утворення інтенсивної і широкої смуги поглинання в області n ~3700–3100 $см^{-1}$. Такі зміни вказують на зростання дрібної фракції дисперсного складу порошку в порівнянні з вихідним зразком. Ці дані підтверджують результати гранулометричного аналізу.

На ІЧ-спектрі монтморилоніту з молочнокислими бактеріями виду *L. plantarum* 337Д з'являються нові смуги в діапазоні частот ν ~ 1500 – – 1300 $см^{-1}$, що відповідають ряду хімічних зв'язків, які описують органічну складову нанокомпозиту (С–О, – СООН, С–Н, N–H) (рис. 4А). В діапазоні частот ν ~ 2960–2800 $см^{-1}$ з'являються слабкі смуги поглинання, що характеризують коливання валентних С–Н зв'язків. Крім того, спостерігається зменшення інтенсивності всіх смуг поглинання в діапазоні частот n ~ 1300 – 450 $см^{-1}$ і ріст інтенсивності смуг, що відносяться до валентних та деформаційних ОН коливань у монтморилоніті в порівнянні з вихідним зразком. Інтенсивність смуги поглинання з частотою ν ~ 922 $см^{-1}$ зменшується. Такі зміни свідчать про взаємодію монтморилоніту з клітинами штаму *L. plantarum* 337Д і утворення композиту на його основі. На відміну від каолініту, в монтморилоніті взаємодія з молочнокислими бактеріями відбувається за рахунок Al– ОН – О зв'язків, де О – кисень сусіднього шару, і завдяки слабкому зв'язку між шарами мінерал має високу ємність катіонного обміну.

За результатами електронно-мікроскопічних досліджень, до складу порошків входять частинки у вигляді пластинок різного розміру. Крім того, у зразку каолініту спостерігаються трубки галуазиту довжиною до 2–3 мкм, що підтверджує дані гранулометричного аналізу та ІЧ-спектроскопії.

Взаємодія клітин молочнокислих бактерій з частинками глинистих мінералів.

Взаємодію між частинками глинистих матеріалів і бактеріальними клітинами вивчали у водних суспензіях. Дослідження композитів з бактеріальних клітин і наночастинок глинистих матеріалів показало, що взаємодія між бактеріями та частинками відбувається за рахунок поверхневих шарів клітинних стінок бактерій, а саме капсульного шару, який має полісахаридну природу (рис. 5). За результатами ТЕМ, трубки галуазиту

мають більшу спорідненість до бактеріальної поверхні у порівнянні з пластинками.

У комплексі глина/бактеріальна клітина зберігається сорбційна ємність та шарова будова глинистих мінералів. При взаємодії клітин штаму *L. plantarum* 337Д з частинками глинистих мінералів характеристики пористого простору практично не змінюються у порівнянні з характеристиками вихідних зразків, розподіл пор за розмірами стає ширшим за рахунок появи пор великого діаметру, зменшується питома поверхня.

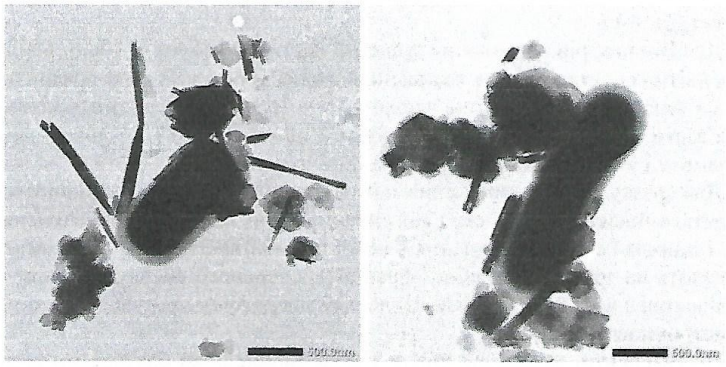


Рис. 5. Взаємодія клітин штаму *L. plantarum* 337Д з частинками каолініту

Вплив глинистих мінералів на ріст штаму L. plantarum 337Д.

Додавання каолініту в культуральне середовище стимулювало ріст штаму *L. plantarum* 337Д, у залежності від концентрації (рис. 6А). Максимальна питома швидкість росту в контрольному середовищі і в середовищі з 1 % каолініту досягалась на 6 годині культивування, тоді як у середовищах з 2 % і 4 % – на 4 години культивування. Найбільший стимулювальний вплив спостерігали при внесенні 4 % каолініту. Так, уже на другу годину культивування питома швидкість росту була більшою у 5,2 рази порівняно з контролем. При внесенні 1 % і 2 % каолініту стимулювальний вплив починався на четвертій годині культивування, питома швидкість росту збільшувалась у 2,9 і 4,8 рази в порівнянні з контролем відповідно. На шосту годину культивування питома швидкість росту в середовищі з 1 % каолініту не відрізнялась від контрольного середовища; в середовищі з 4 % каолініту стимулювальний вплив зберігався, але в середовищі з 2 % каолініту питома швидкість росту дещо знижувалась (у 1,15 рази порівняно з контролем). Після 8 годин культивування питома швидкість росту штаму *L. plantarum* 337Д у середовищах з 1 % і 2 % каолініту не відрізнялась від контролю. У той же час після 8 і 10 годин культивування в середовищі з 4 % каолініту питома швидкість росту була вищою в порівнянні з контролем, у 1,12 і 1,18 рази відповідно.

При вирощуванні штаму *L. plantarum* 337Д в середовищі з монтморилонітом (рис. 6Б) вже на другу годину культивування спостерігали підвищення питомої швидкості росту в порівнянні з контролем у 6,0, 3,6 і 2,3 рази при концентраціях 1 %, 2 % і 4 % відповідно. На четверту годину культивування стимулювальний вплив

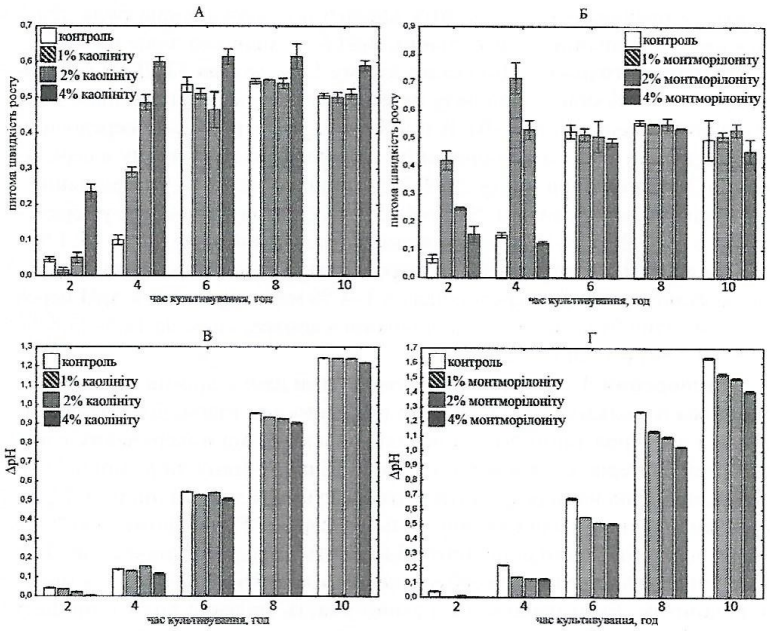


Рис. 6. Вплив каолініту і монтморилоніту на швидкість росту і кислотоутворення штаму *L. plantarum* 337Д *in vitro*

1 % і 2 % монтморилоніту в середовищі зберігався, питома швидкість росту в порівнянні з контролем була більшою в 4,6 і 3,4 рази відповідно. У той же час, питома швидкість росту в середовищі з 4 % монтморилоніту була в 1,21 рази меншою в порівнянні з контролем. Після 6 години культивування питома швидкість росту штаму *L. plantarum* 337Д в контрольному середовищі і в середовищах з монтморилонітом не відрізнялась.

Ріст молочнокислих бактерій супроводжується зниженням pH середовища внаслідок утворення молочної кислоти як кінцевого продукту розщеплення вуглеводів. Досліджено динаміку зниження pH середовищ з різним вмістом каолініту чи монтморилоніту і порівняно її зі зниженням pH у контрольному середовищі. За наявності каолініту процес закислення середовища відбувався повільніше порівняно з контролем (рис. 6В). Різниця між значенням pH середовища на початку культивування і через 2 години (ΔpH) була меншою в порівнянні з контролем на 14,3 %, 50 % і 90,5 % у середовищах з 1 %, 2 % і 4 % каолініту відповідно. Через 4 години культивування показник ΔpH середовищ з 1 % і 4 % каолініту був меншим на 5 % і 17,8 % відповідно в порівнянні з ΔpH контрольного середовища. У той же час у середовищі з 2 % каолініту спостерігали збільшення значення ΔpH на 12 % в порівнянні з контролем. Через 6 годин культивування ΔpH в середовищах з 1 % і 4 % каолініту зменшилась на 3 % і 7,2 % відповідно, а ΔpH у середовищі з 2 % каолініту не відрізнялась від контрольного. Через 8 годин ΔpH у середовищах з 1 %, 2 % і 4 % була меншою на 2,2 %, 3 % і 5,5 % відповідно. На 10 годину культивування

тільки за наявності 4 % каолініту кислотність середовища була дещо нижчою в порівнянні з контрольним, ΔpH була меншою лише на 2 %.

Протягом 2 годин культивування штаму *L. plantarum* 337Д pH середовища з 1 % і 4 % монтморилоніту не змінювався (рис. 6Г) порівняно з початковим значенням (ΔpH=0). В той же час, у контрольному середовищі і в середовищі з 2 % монтморилоніту pH знижувався, причому в середовищі з 2 % монтморилоніту ΔpH була меншою на 87 % у порівнянні з контрольним середовищем. Через 4 години культивування ΔpH у середовищах з 1 %, 2 % і 4 % монтморилоніту була меншою на 37 %, 41,4 % і 43,7 % відповідно порівняно з контрольним середовищем. При подальшому культивуванні у середовищах з 1–4 % монтморилоніту ΔpH через 6, 8 і 10 годин була меншою в порівнянні з контрольним на 18,5–25,8 %, 10,5–49,7 % і 6,7–14,0 % відповідно.

Обговорення. Порівнювати отримані нами дані з даними інших авторів на жаль складно, оскільки було показано, що взаємодія мікроорганізмів і частинок глинистих мінералів залежить від поверхневих властивостей бактеріальних клітин, їх фізіологічного стану чи розмірів [12]. Однак, отримані нами результати підтверджуються даними інших авторів. Показано, що найбільш важливу роль в адсорбції *Pseudomonas putida* на гетиті, каолініті і монтморилоніті відіграють електростатичні сили [16]. Клітини *P. putida* краще адсорбувались на каолініті в порівнянні з монтморилонітом. Було продемонстровано участь молекул води у процесі сорбції бактерій *P. putida* на глинистих мінералах каолініті й монтморилоніті [19]. Нами встановлено, що інтенсивність усіх смуг ІЧ поглинання, як для суспензії каолініту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д, так і суспензії монтморилоніту і клітин штаму *L. plantarum* 337Д зменшується у порівнянні з вихідними зразками за рахунок адсорбції на поверхні органічних складових.

Додавання глинистих мінералів у середовище MRS прискорювало ріст штаму *L. plantarum* 337Д і уповільнювало процес зниження pH середовища в порівнянні з контролем. Стимулювальний вплив на ріст штаму *L. plantarum* 337Д 4 % каолініту у середовищі спостерігали вже через дві години культивування й щонайменше після 10 годин культивування. Стимулювальний вплив 1–2 % каолініту спостерігали лише на четвертій годині культивування. Таким чином, максимальний стимулювальний вплив монтморилоніту проявлявся після двох годин культивування і тривав до шостої години. Слід відзначити незначний пригнічувальний вплив глинистих мінералів на ріст штаму *L. plantarum* 337Д. Питома швидкість росту після 6 годин культивування в середовищі з 2 % каолініту була меншою в 1,15 рази порівняно з контролем. При цьому 4 % монтморилоніту в середовищі дещо уповільнювали (в 1,21 рази) ріст штаму *L. plantarum* 337Д на четвертій годині культивування. Стимулювальна дія глинистих мінералів на ростову та фізіологічну активності представників мікробіоти ґрунту була встановлена в ряді досліджень [6, 7, 9].

Авторами [20] зроблено припущення, що іонообмінні властивості глинистих мінералів можуть змінювати характеристики середовища кишечнику, такі як pH чи ступінь окислення, і таким чином впливати на ріст бактерій мікробіоти кишечнику. Показано, що частинки глинистих мінералів стимулюють процес дихання бактерій, в основному за рахунок

підтримки pH середовища, найбільш сприятливого для їх активного росту [21].

Отже, встановлено, що різний вплив на ріст штаму *L. plantarum* 337Д може бути обумовлений відмінностями фізико-хімічних характеристик каолініту і монтморилоніту, використаних у роботі. Для каолініту значення питомої поверхні мезопор сягає 23,2 м^2/г, а середній їх розмір – 9,4 нм. Монтморилоніт має мезопористу нежорстку шарувату структуру з переважно щілинною будовою пор та високими значеннями питомої поверхні та об'єму мезопор. Значення питомої поверхні мезопор сягає 94,8 м^2/г. Майже 50 % об'єму та поверхні мезопор належить порам вузького діапазону 3,6–4,1 нм (при загальному об'ємі мезопор 0,11см^3/г), які забезпечують високий потенціал взаємодії з адсорбованими молекулами водного середовища та продуктів метаболізму штаму *L. plantarum* 337Д, зокрема молочної кислоти. Слід зазначити, що процес адсорбції на монтморилоніті супроводжується набуханням не тільки за рахунок його молекулярної будови, але й за рахунок його супрамолекулярної будови — пор вузького діапазону 3,6–4,1 нм.

Дослідження взаємодії клітин бактерій з глинистими мінералами має важливе практичне значення. Авторами [1] було встановлено, що адсорбційні взаємодії між клітинами бактерій і глинистим мінералом палигорскітом підвищують виживання бактерій при їх зневодненні при висушуванні, а також ефективність седиментаційного відділення біомаси від культуральної рідини, що може бути корисним при отриманні сухих бактеріальних препаратів. Одержані в роботі результати дослідження впливу частинок каолініту і монтморилоніту на культури молочнокислих бактерій можуть бути застосовані у медичній та фармацевтичній промисловості для створення нових препаратів, а також для розробки нових біологічних добавок для підвищення продуктивності птахівництва і тваринництва. Отже, отримані нами дані мають важливе практичне значення і є підставою для подальшого, більш поглибленого вивчення впливу частинок глинистих мінералів на фізіолого-біохімічну активність молочнокислих бактерій.

И.Л. Гармашева[1], Н.К. Коваленко[1], В.С. Подгорский[1], Е.П. Ливинская[1], С.И. Войчук[1], Л.Т. Олещенко[1], Т.В. Томила[2], Т.Ф. Лобунец[2]

[1]Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина
[2]Институт проблем материаловедения им. М.И. Францевича НАН Украины, ул. Кржижановского, 3, Киев, 03680, Украина

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК ШТАММА *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 337Д УКМ В-2627 С ГЛИНИСТЫМИ МИНЕРАЛАМИ *IN VITRO*

Резюме

Цель. Охарактеризовать взаимодействие клеток штамма *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627, который обладает пробиотическими свойствами, с каолинитом и монтмориллонитом. **Методы.** Использованы методы инфракрасной спектроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии, адсорбционно-структурный статичный объемный метод, микробиологические и статистические методы. **Результаты.** При

взаимодействии клеток штамма *L. plantarum* 337Д с частицами глинистых минералов характеристики пористого пространства последних практически не изменялись в сравнении с исходными образцами, распределение пор по размерам стало более широким за счет появления пор большого диаметра, уменьшалась удельная поверхность, но сорбционная емкость и слоистое строение глинистых минералов сохранялось. Впервые установлено влияние каолинита и монтмориллонита на рост штамма *L. plantarum* 337Д in vitro. Наибольшее стимулирующее влияние глинистых минералов наблюдалось через два часа культивирования. Удельная скорость роста штамма *L. plantarum* 337Д была в 5,2 раза больше при культивировании в среде MRS с 4 % каолинита и в 6 раз больше – в среде MRS с 1 % монтмориллонита в сравнении с контролем. Наличие в среде каолинита или монтмориллонита замедляло процесс снижения pH при культивировании штамма *L. plantarum* 337Д в сравнении с контролем. При наличии монтмориллонита pH среды снижался медленнее, чем при наличии каолинита. Разница между значением pH среды с 4 % каолинита в начале культивирования и через два часа (ΔpH) была в 10 раз меньше в сравнении с контролем. В то же время pH среды с 1 % и 4 % монтмориллонита начинал снижаться через 4 часа культивирования. **Выводы.** Разное влияние на рост штамма *L. plantarum* 337Д обусловлено отличиями физико-химических характеристик каолинита и монтмориллонита, использованных в работе.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, алюмосиликаты, каолинит, монтмориллонит.

I.L. Garmasheva[1], N.K. Kovalenko[1], V.S. Pidgorskyi[1], O.P. Livins'ka[1], S.I. Voychuk[1], L.T. Oleschenko[1], T.V. Tomila[2], T.F. Lobunets[2]

[1]Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, 154 Acad. Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine
[2]Frantsevich Institute for Problems in Materials Science NAS of Ukraine, 3 Krzhizhanovsky Str., Kyiv, 03680, Ukraine

INTERACTION OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 337D UKM B-2627 STRAIN CELLS WITH CLAY MINERALS *IN VITRO*

Summary

Objective. To characterize the interaction of *Lactobacillus plantarum* 337D UKM B-2627 strain, which has probiotic properties, with kaolinite and montmorillonite. **Methods.** The methods of infrared spectroscopy, transmission electron microscopy, the adsorption-structural static volumetric method, microbiological and statistical methods were used. **Results.** The characteristics of the porous space of clay mineral particles were practically did not change compared with initial samples during the interaction with *L. plantarum* 337D UKM B-2627 strain cells, pore size distribution had become wider due to the emergence of large diameter pores, reduced surface area, but the adsorption capacity and the layered structure of clay minerals preserved. For the first time the effect of kaolinite and montmorillonite on growth of *L. plantarum* 337D strain *in vitro* was studied. The greatest stimulating effect of clay minerals was observed within two hours of cultivation. The specific growth rate of *L. plantarum* 337D strain was in 5.2 times higher when cultured in MRS medium with 4 % of kaolinite and 6 times more – in MRS medium with 1 % montmorillonite versus control. The presence in the medium of kaolinite or

montmorillonite slowed the process of reducing pH during growth of the *L. plantarum* 337D strain, compared with the control. In the presence of montmorillonite pH decreased more slowly than in the presence of kaolinite. The difference between initial pH value of medium with 4 % kaolinite and after two h (ΔpH) was 10 times less in comparison with the control. At the same time, pH of the medium with 1 % or 4 % montmorillonite began to decrease after 4 hours of cultivation. **Conclusions.** Different effect on the growth of *L. plantarum* 337D strain due to differences of physical and chemical characteristics of kaolinite and montmorillonite used in the study.

K e y w o r d s: lactic acid bacteria, aluminosilicates, kaolinite, montmorillonite.

1. *Гордиенко А.С., Курдиш И.К., Краснобрижский Н.Я.* Влияние глинистого минерала палыгорскита на выживаемость бактерий при обезвоживании // Микробиол. журн. – 1990, Т. 52, № 5.– С. 75–78.
2. *Грег С., Синг К.* Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984, 310 с.
3. *Егоров Н.С.* Промышленная микробиология. «Высшая школа».– Москва.–1989.– С. 688.
4. *Квасников Е.И., Григоров Ю.Г., Коваленко Н. К. и др.* Молочнокислые бактерии пищеварительного тракта и питание долгожителей Абхазии // Микроб. журн.– 1984.– Т. 46, № 3.– С. 11–18.
5. *Коваленко Н.К., Немировская Л.Н., Касумова С.А.* Бактериоциногенная и лизоцимстимулирующая активность молочнокислых бактерий //Мікробіол. журн.– 1999, Т. 61, № 6.– С. 42–50.
6. *Курдиш И.К., Кигель Н.Ф.* Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность метанотрофных бактерий // Мікробіол. журн.– 1997, Т. 59, № 2.– С. 29–35.
7. *Курдиш И.К., Мельникова Н.Н.* Влияние глинистых минералов на рост и нодуляционную активность *Bradyrhizobium japonicum*// Мікробіол. журн.– 2011.– Т. 73, № 4. – С. 36–40.
8. *Подгорский В.С., Коваленко Н.К., Гармашева И.Л., Лившская Е.П., Рагуля А.В., Томила Т.В., Лобунец Т.Ф.* Нанокомпозиты на основе глинистых материалов и биологически активных клеточных компонентов пробиотических штаммов молочнокислых бактерий, С. 446–450 // «Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине». Главный редактор Наумовец А.Г. Киев: Академпериодика, 2014, 768 с.
9. *Чоботарьов А.Ю., Гордієнко А.С., Курдиш І.К.* Вплив природніх мінералів на ріст *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 // Мікроб. журн.– 2010.– Т. 72, № 5. – С. 27–31.
10. *Cai Y., Meng X., Cao Y., Lu H., Zhu S., Zhou L.* Montmorillonite ameliorates hyperthyroidism of rats and mice attributed to its adsorptive effect // Eur. J. Pharmacol. – 2006.– 551.– P. 156–161.
11. *De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E.* A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960.– 23.– P. 130–135.
12. *Gannon J.T., Manilal V.B., Alexander M.* Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – 57.– P. 190–193.

13. *Gardiner K.R., Anderson N.H., McCaigue M.D., Erwin P.J., Halliday M.I., Rowlands B.J.* Adsorbents as antiendotoxin agents in experimental Colitis // Gut.– 1993.– 34.– P. 51–55.
14. *Guarino A., Bisceglia M., Castellucci G. et al.* Smectite in the treatment of acute diarrhea: a nationwide randomized controlled study of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) in collaboration with primary care pediatricians. SIGEP Study Group for Smectite in Acute Diarrhea // J Pediatr Gastroenterol Nutr.– 2001.– 32.– P. 71–75.
15. IUPAC Manual of Symbols and Terminology, Appendix 2, Pt. I, Colloid and Surface Chemistry. Pure Appl. Chem., 31 578 (1972).
16. *Jiang D., Huang Q., Cai P., Rong X., Chena W.* Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.– 2007.– 54.– P. 217–221
17. *Li J., Kim I.H.* Effects of dietary supplementation of sericite on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles and fecal microflora shedding in growing pigs // Anim Feed Sci Technol. – 2013.–184.– P. 100–104.
18. *Phillips T.D.* Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxine-induced disease // Toxicol Sci.– 1999.– 52.– P. 118–126.
19. *Rong X., Huang Q., He X., Chen H., Cai P., Liang W.* Interaction of *Pseudomonas putida* with kaolinite and montmorillonite: A combination study by equilibrium adsorption, ITC, SEM and FTIR // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.– 2008.– 64.– P. 49–55
20. *Song M., Liu Y., Soares J.A., Che T.M., Osuna O., Maddox C.W. et al.* Dietary clays alleviate diarrhea of weaned pigs // J Anim Sci. 2012.–90.– P. 345–60.
21. *Stotzky G., Rem L.T.* Influence of clay minerals on microorganisms. Montmorillonite and kaolinite on bacteria // Can J Microbiol.– 1966.– 12.– P. 547–563.
22. *Thacker P.A.* Performance of growing-finishing pigs fed diets containing graded levels of biotite, an aluminosilicate clay // Asian-Aust J Anim Sci.– 2003.–16.– P. 1666–1672.
23. *Wang J.P., Chi F., Kim I.H.* Effects of montmorillonite clay on growth performance, nutrient digestibility, vulva size, faecal microflora, and oxidative stress in weaning gilts challenged with zearalenone // Anim Feed Sci Technol.– 2012.–178.– P. 158–166.
24. *Xia M.S., Hu C.H., Xu Z.R., Ye Y., Zhou Y.H., Xiong L.* Effects of copper–bearing montmorillonite (Cu-MMT) on Escherichia coli and diarrhea on weanling pigs // Asian-Aust J Anim Sci.– 2004.–17.– P1712–1716.
25. *Xia M.S., Hu C.H., Xu Z.R.* Effects of copper bearing montmorillonite on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs // Anim Feed Sci Technol. – 2005.– 118.– P. 307–317.
26. *Zhang Y., Wang X., Long L., Liu T., Cao Y.* Montmorillonite adsorbs creatinine and accelerates creatinine excretion from the intestine // J. Pharm. Pharmacol.– 2009.– 61.– P. 459–464.

Отримано 17.05.2016

Original Article

APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY, 2016, 3 (3):188-193
Journal homepage: www.journals.sbmu.ac.ir/afb

pISSN: 2345-5357
eISSN: 2423-4214

Growth Optimization of *Lactobacillus plantarum* T5jq301796.1, an Iranian Indigenous Probiotic in Lab Scale Fermenter

*Faranak Noori[1], Maryam Tajabadi Ebrahimi[*2], Parvaneh Jafari[3]*

1. Department of Microbiology, College of Sciences, Saveh Science and Research Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University Arak Branch, Arak, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Lactobacillus plantarum* is one of the probiotics species used in functional food products. These bacteria or their purified bacteriocins are used as biological preservatives in the food industry. The first step in production of an array of probiotic products is optimizing production in fermentors. This study aimed to examine factors affecting the in vitro growth optimization of *Lactobacillus plantarum* T5JQ301796.1 in a lab scale fermentor.

Materials and Methods: Following 24 hours of anaerobic culture of the lactobacillus at 37°C, the pre-culture was ready and was inoculated to a 5 liter fermentor at 37°C and stirred at 40 rpm. Then factors affecting lactobacillus growth including carbon and nitrogen sources and pH were studied. The results were interpreted using response surface methodology (RSM), and optimal conditions for the equipment were determined.

Results and Conclusion: For optimal growth of *Lactobacillus plantarum* T5JQ301796.1 in lab scale fermentor, the optimal conditions were 25.96 gl^{-1} of glucose, 1.82% of yeast extract, pH of 7.26, and stirring at 40 rpm at optimum temperature between 37-40°C. In this condition, maximum viable cell in the batch fermentation was 1.25×10^{10} CFU ml^{-1}. Application of central composite design for the growth optimization of this bacterium led to maximum viable cells equal to 1.25×10^{10} CFU ml^{-1}. So the mentioned features can lead to optimum industrial scale production and usage of this probiotic strain in probiotic products.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Article Information

Article history
Received 19 Feb 2016
Revised 24 Apr 2016
Accepted 2 July 2016

Keywords
Fermentor
Lactobacillus plantarum
Optimization
Probiotic
Response surface methodology

Correspondence to
Maryam Tajabadi Ebrahimi
Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran.
P O. Box: 14155-8189
Tel: +98-21-88983647
Fax: +98-21-88983647
E-mail: m.tajabadi@iauctb.ac.ir

1. Introduction

Probiotics are rather new products, which are usually consumed in fermented foods [1-3]. Probiotics are usually defined as living microorganisms, which their sufficient consumption improves the host's health [4]. Lactic acid bacteria (LAB) are the most common microorganisms used as probiotics [5]. There has been a rising demand for probiotic products in recent years. Thus, industrial and semi-industrial fermentation of probiotics can underlie the importance of these products as generally recognized as safe (GRAS) products [6,7].

LAB are gram-positive, acid tolerant, nonsporogenic, anaerobic bacilli or cocci [8]. Lactic acid production is considered as the most common activity of these bacteria [5,9]. Members of this extensive group are used as probiotics because they prevent stable attachment, settlement and proliferation of pathogens in the gastrointestinal sy-

stem, and suppress precarcinogenic tumors [10,11]. LAB can regulate the immune system, and eliminate harmful effects of stress [12,13]. Accordingly, production of these bacteria has increased considerably [14].

LAB grow hardly, and many elements like carbohydrates, amino acids, peptides, nucleic acids, and vitamins are required for their optimal growth [15]. Fermentation conditions including the pH, temperature, aeration, standardization and compounds of culture medium are the most important and influential factors in their growth [16]. Microbial growth optimization can be performed in different methods, such as Response Surface Method (RSM) [17,18]. RSM can be used for assessing the relative importance of various factors in the presence of complex interactions [19]. It is a powerful test technique for multi level factors, as it requires fewer practical laboratory tasks compared to studying one factor at a time [20]. With RSM, different levels of functional factors can be used to achieve maximum efficiency with minimum tests.

The most common practical method in RSM is application of Central Composite Design (CCD), as coefficients of the second degree model can be estimated easily [13]. In this study, CCD was used in RSM. Variables of glucose concentration, yeast extract, and pH were studied for designing tests in two levels.

The ultimate aim of this study is to find optimal growth conditions to maximize biomass production.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

In the present study, *Lactobacillus* (*L.*) *plantarum* T5JQ301796.1 stored in glycerol 25% at -80°C was used. This bacterium was previously isolated from Tarkhineh (a traditional Iranian fer-mented food stuff) whose genome has been altered to produce a more productive strain. Inoculation and culture media comprised 20 gl^{-1} of glucose, 10 gl^{-1} of yeast extract, 0.2 gl^{-1} of sodium phosphate, 0.2 of gl^{-1} di-potassium phosphate, 0.01 of gl^{-1} magnesium sulfate, 1 gl^{-1} of Twin 80 (all ingredients from Merck, Germany) , and 1 ml^{-1} of vitamin solution [23]. The vitamin solution included 2 gl^{-1} of pyridoxine hydro-chloride, 1gl^{-1} of pantothenic acid, 1 gl^{-1} of niacin, 1 gl^{-1} of riboflavin, and 1 gl^{-1} of folic acid.

It was first filtered and then added to sterile culture medium before inoculation. Five ml of stored culture was inoculated into 200 ml of liquid MRS culture medium, and incubated at 37°C for 48 hours to prepare inoculum. The resulting cells were centrifuged at 3000 ×g for 15 minutes, rinsed twice with PBS buffer, and then used as inoculum. To determine the effects of carbon, nitrogen, and pH on the growth of lactobacilli, all other factors and compounds were kept constant, and only the level of testing factor was considered variable. Optical density of the samples was determined after performing tests and fermentation process. Thus, based on previews experiments, the range of the factors for optimal growth was identified. Accordingly, the best range was 20 gl^{-1} for glucose, 0.7 gl^{-1} for nitrogen source, and 7 for pH. CCD test was designed for optimization of the fermentor according to the data obtained from the range tests.

2.2. Experimental design and statistical analysis

Optimization of biomass production was designed based on 2-level, 3-factor RSM method using CCD, which resulted in 15 tests. Independent variables included initial pH, glucose and yeast extract concentrations.

Table 1. Factors (and their levels) affecting growth of *L. plantarum* T5jq301796.1 in lab scale fermenter.

Factor	Code	Unit	Lower level	Upper level
pH	A	-	4.0	8.0
Glucose	B	gl^{-1}	15.0	30
Yeast extract	C	gl^{-1}	0.7	2.0

Dependent variable of optical density was measured by spectrophotometer. Fifteen designed tests were performed randomly. The amount of yeast extract and lactose added varied according to the requirements of each experiment. The initial pH of culture medium was adjusted by HCl (N=5) or NaOH (N=5).

Table 2. Responses of the central composite design for evaluation of impact of three factors on growth of *L. plantarum* T5jq301796.1 in lab scale fermenter.

Run	Glucose (gl^{-1})	Yeast extract (gl^{-1})	pH	OD
1	10.00	0.20	3.00	0.42
2	25.00	2.61	5.50	0.90
3	40.00	2.20	3.00	0.60
4	25.00	1.20	5.50	1.54
5	25.00	1.20	5.50	1.30
6	25.00	1.20	9.04	1.02
7	3.79	1.20	5.50	1.20
8	25.00	0.10	5.50	1.56
9	25.00	1.20	5.50	0.43
10	46.21	1.20	5.50	0.61
11	10.00	2.20	8.00	1.55
12	25.00	1.20	5.50	0.52
13	40.00	0.20	8.00	0.19
14	25.00	1.20	1.96	1.58
15	25.00	1.20	5.50	0.80

2.3. Fermenter

Biomass production of *L. plantarum* T5JQ301796.1 was performed in a fermentor, model Electrolab, Fermac 360-UK, with working volume of 5 litters. For each fermentation run, 500 ml pre-culture was inoculated to 4500 ml of the culture medium prepared with desired composition acco-rding to RSM runs. The fermentor was set up at 37°C and 40 rpm. Aeration was not required because *L. plantarum* is an anaerobic bacterium. This process lasted 24 hours, and periodical sampling was performed every 2 hours. After each expe-

riment, the resulting cell mass was measured at 600 nm using spectrophotometer (Vis-Genus, UV mini-1240 UV). Colony forming unit was evaluated by the serial dilutions method on MRS agar culture medium. Before cell count, the samples were incubated at 37°C for 48 hours. Each sample was cultured in plates in two replicates.

2.4. Analytical methods

After every experiment, the resulting cell mass was measured at 600nm using spectrophotometer (Vis-Genus, UV mini-1240 UV).

Viable bacterial cells were produced using serial dilutions and culture method in MRS agar culture medium. Each sample was cultured in plates in two replicates. Before cell count, the samples were incubated at 37°C for 48 hours. In this experiment, pH, glucose and yeast extract concentrations were considered as influential factors in growth optimization using CCD method. Parameters were benchmarked according to the initial experiments. ANOVA test for Quadratic model and analysis of variance was performed; in other words, ($p \leq 0.05$) indicate the significance of the results of this test.

3. Results and Discussion

In recent years, the world has witnessed extensive advances in the role of biotechnology in qualitative and quantitative improvement of food and consumer health, especially through the use of beneficial bacterial strains at industrial and commercial levels. Probiotic bacteria play an effective and significant role in human health through control of pathogenic strains in the digestive system and improving the immune system. Effectiveness of these bacteria depends on their stability during production, formulation and storage conditions [24].

Modern laboratory techniques and methods are being studied for optimizing production and extending use of these health promoting microbial agents [4]. Beukes et al. and Lim et al. isolated and identified, *L. plantarum*, *L. delbrukii* and *L. Salivarius* from samples of a traditional dairy product called *amasi* in South Africa and Namibia [25].

Sathyanarayanan et al. conducted a study on riboflavin produced by *L. fermentum* isolated from yoghurt samples. In their study, riboflavin was produced by lactic acid bacteria separated from fermented milk samples. *L. fermentum* MTCC8711 produced large amounts of riboflavin. RSM was used for optimization of fermentation and lactobacillus bacterial growth, and consequently, riboflavin production [26].

RSM is a powerful tool in optimizing the fermentation medium for Lactobacilli. However, Ghasemi and Ahmadzadeh used RSM for optimization of culture medium for mass production of *bacillus subtilis* UTB96 with laboratory and semi industrial fermenters [27].

In the current study, pH, glucose and yeast extract concentrations were considered as influential factors in growth optimization. We selected the effective parameters based on the initial experiments (Table 1). Conditions of influential factors and optical density results are presented in Table 2, and the ANOVA test results for the second degree model and variance analysis are shown in Table 3. Data processing with resulted the below fitted equation based in coded value: Eq 1.

Optical Density= 1.64+0.067 A+0.17 B+ 0.18 C+ 0.47 AB+ 0.38 AC+ 0.16 BC- 0.33 A2- 0.35 B2- 0.29 C2

Where, A: glucose (gl^{-1}), B: yeast extracts (gl^{-1}), and C: pH

Based on the result, the fitted model was calculated and given by software. It means that biomass production by this bacterium follow this model and it can predict the biomass production in different conditions. The results of this study showed that the model used here was appropriate because, according to the p-value, there was only probability of 1.16% ($p \leq 0.016$) for error appearance in these results. According to the p-values presented in Table 3, AB, AC, A2, B2 and C2 are also significant in this model. Whatever the number of factors used in the model is more significant in the case of the proposed model is more appropriate.

Three dimensional surface plots exhibited the optical density of *L. plantarum* T5 JQ301796.1 growth for different combinations of variables. Plots are depicted as a function of two variables while the others are fixed at zero level. Examining the interaction of influential factors showed that at constant glucose concentration of 15 gl^{-1}, the growth level reduces with increasing the yeast extract concentration from 0.7 gl^{-1} to 2 gl^{-1}. At constant yeast extract concentration of 0.7 gl^{-1}, the growth level dramatically reduces with increasing carbon from 15 gl^{-1} to 30 gl^{-1}, and when carbon density is kept constant at 30 gl^{-1}, the growth level significantly increases with increasing the yeast extract from 0.7 gl^{-1} to 2 gl^{-1} (Figure 1). Furthermore, at constant glucose concentration of 15 gl^{-1}, the growth level slightly reduces with increasing the pH from 4 to 8, and at constant pH value of 4, it significantly reduces with increasing the carbon concentration from 15 gl^{-1} to 30 gl^{-1}. Yet, the growth significantly increases with increasing the pH from 4 to 8 at constant carbon concentration of 30 gl^{-1} (Figure 2). The effects of nitrogen concentration and pH on growth are shown in Figure 3. Accordingly, at constant pH of 8, the growth rate significantly

Table 3. Analysis of variance for evaluation of impact of three factors on growth of *L. plantarum* T5jq301796.1 in lab scale fermenter.

	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	p-value	
Source model	3.065	9	0.341	9.515	0.0116	Significant
A-C source	0.018	1	0.018	0.504	0.5093	
B-N source	0.115	1	0.115	3.219	0.1328	
C-pH	0.125	1	0.125	3.493	0.1206	
AB	0.445	1	0.445	12.438	0.0168	
AC	0.288	1	0.288	8.057	0.0363	
BC	0.049	1	0.049	1.381	0.2929	
A^2	0.816	1	0.816	22.794	0.005	
B^2	0.933	1	0.933	26.057	0.0038	
C^2	0.661	1	0.661	18.465	0.0077	
Residual	0.179	5	0.036			
Lack of Fit	0.125	1	0.125	9.275	0. 382	Not significant
Pure Error	0.054	4	0.013			
Total	3.244	14				

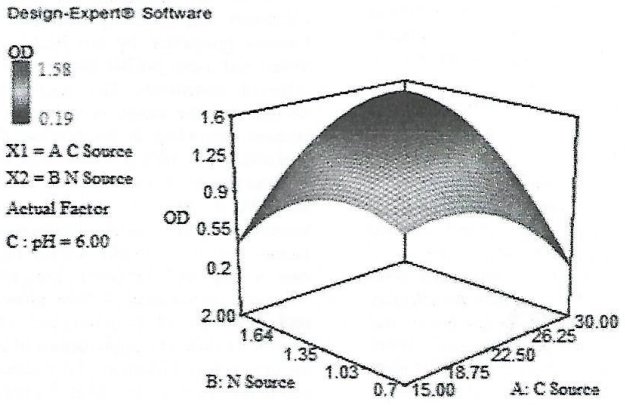


Figure 1. Interaction effect of yeast extract and glucose on growth rate of *L. plantarum* T5jq301796.

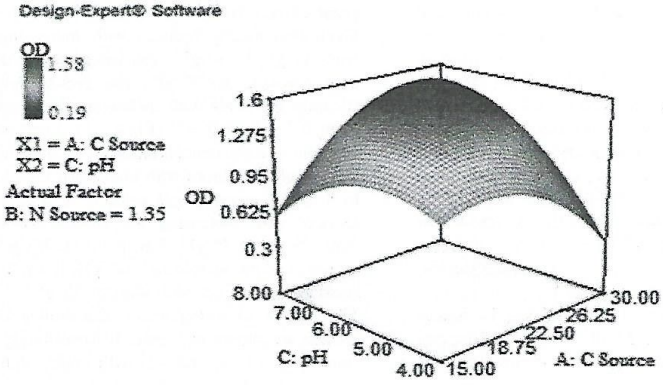


Figure 2. Main effects of carbon density and pH on growth rate of *L. plantarum* T5jq301796.

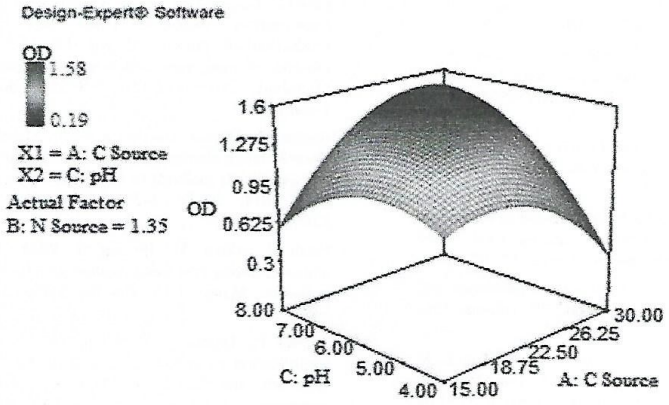


Figure 3. Effects of nitrogen concentration and pH on growth rate.

increases with increasing the yeast extract concentration from 0.7 gl^{-1} to 2 gl^{-1}. However, at pH of 4, the growth level initially increases, and then reduces with increasing the yeast extract concentration from 0.45 to 1.35 gl^{-1}. At high yeast extract concentration (2 gl^{-1}), the growth rate significantly increases with increasing the pH, while at low concentration of the yeast extract, increasing the pH value has no significant effect on the growth rate (Figure 3). The second order polynomial equation provided optimal values of independent variables and proposed maximum optical absorption. Optimal conditions for the above bacterium are provided by the following values:

pH=7.26, glucose=25.96 gl^{-1}, and yeast extract=1.82 gl^{-1}

To examine the predicted results after confirmatory test and OD measurement, optical absorption in these conditions was found 1.85, which is close to the experimented result that was 1.70.

4. Conclusion

Given the increasing spread of industrial dairy products instead of traditional ones, it is possible that many probiotic bacteria are lost. It is, therefore, necessary to isolate and identify these bacteria from traditional food sources, and use them in dairy products. Thus, optimization of production in a fermentor is the first step in producing a wide range of probiotic products based on these bacteria.

In this study, pH, glucose and yeast extract concentrations were considered as influential factors in growth optimization using CCD method. The parameters were benchmarked according to the initial experiments of influential factors and OD results.

On the basis of medium optimization, the second degree polynomial model predicted the maximum OD_{600} by *L. plantarum* as 1.85 (equal to 1.25×10^{10} CFU ml^{-1}) in the medium containing 25.96 and 1.82 gl^{-1} of glucose and yeast extract, respectively, in pH 7.26, temperature 37-40°C, and stirring at 40 rpm. Experimental studies showed a good correlation between the predicted and experimental OD values.

5. Acknowledgement

This work was supported by Islamic Azad University, Tehran Center Branch (Tehran, Iran).

6. Conflict of interests

None of the authors had any personal or financial conflict of interest.

References

1. Esteban-Torres M, Mancheño JM, de las Rivas B, Munoz R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria Lactobacillus plantarum useful in food fermentations. LWT-Food Sci Technol. 2015; 60(1): 246-252. doi:10.1016/j. lwt.2014.05.063
2. Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JA. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. Compr Rev Food Sci Food Safety. 2010; 9(3): 292-302. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x
3. Mattila-Sandholm T, Myllärinen P,Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M. Technological challenges for future probiotic foods. Int Dairy J. 2002; 12(2): 173-182. doi:10.1016/S0958-6946(01-)00099-1
4. Pineiro M, Stanton C. Probiotic bacteria: Legislative framework-requirements to evidence basis. J Nutr. 2007; 137(3): 850S-853S.
5. Tannock G.W.Probiotic properties of lactic-acid bacteria: Plenty of scope for fundamental R & D. Trend Biotechnol. 1997; 15(7): 270-274.
6. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly Ch, Kiely B , O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. In vitro selection criteria for

probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr. 2001;73(2): 386s-392s.

7. Collins J, Thornton G, Sullivan G. Selection of probiotic strains for human applications. Int Dairy J. 1998; 8(5): 487-490. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00073-9
8. Wood BJB, Warner PJ. Genetics of lactic acid bacteria. Vol. 3. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2012.
9. Senthilkumar P. Antibacterial potential of lactic acid bacteria and its metabolites against food borne pathogens. Int J Pharm Biol Sci Arch 2012; 3(2):
10. Lee YK, Salminen S. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons. 2nd edition. New Jersey, USA, 2009.
11. Jung-Woo L, Jung-Gul Sh, Eun Hee K, Hae Eun K, In Been Y, Ji Yeon K, Hong-Gu J, Hee Jong W. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. J Vet Sci 2004; 5(1): 41-48.
12. Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. Immunol.Cell Biol. 2000; 78(1): 67-73. doi: 10.1046/j.1440-1711.2000.00887.x
13. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. Current Opin Inf Dis. 2002; 15(5): 501-506.
14. O'Shea EF, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. Curr Opin Biotechnol, 2013; 24(2): 130-134. doi:10.1016/j.copbio.2012.12.003
15. Katharina E. Scholz A, Berit A, Florence R, Denis V B, Michael de V, Yahya Al, Jürgen S. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats -impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. NFS J. 2016; 3: 41-50. doi:10.-1016/j.nfs.2016.03.001
16. Jiang Q, Stamatova I, Kari K, Meurman JH. Inhibitory activity in vitro of probiotic lactobacilli against oral Candida under different fermentation conditions. Beneficial Microbes. 2014; 6(3): 361-368. doi: 10.3920/BM2014.0054
17. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. WIREs CompStat. 2010; 2(2): 128-149. doi: 10.1002/wics.73
18. Lew LC, Liong MT, Gan CY. Growth optimization of Lactobacillus *rhamnosus* FTDC 8313 and the production of putative dermal bioactives in the presence of manganese and magnesium ions. J Appl Microbiol. 2013; 114(2): 526-535. doi:10.1111/jam.12044
19. Burket M, Antonio Davila , Kandarp Mehta, Daniel Oyon.Relating alternative forms of contingency fit to the appropriate methods to test them. Manag Accoun Res. 2014; 25(1): 6-29. doi:10.1016/j.mar.2013.07.008
20. Falah B, Akour M, Bouriat S. RSM: Reducing mutation testing cost using random selective mutation technique. Malays J Comput Sci 2015; 28(4): 338-347.
21. Tafvizi F, Tajabadi EM, KHojareh L. Molecular identification of probiotic lactobacill bacteria from tarkhineh and tarkhineh dough by 16s RDNA sequencing. J FoodTech Nutr. 2013; 10; (38) 61-68.
22. Tafvizi F, Tajabadi EM. Application of repetitive extragenic palindromic elements based on pcr in detection of genetic relationship of lactic acid bacteria species isolated from traditional fermented food products. J Agric Sci Technol. 2015; 17(1): 87-98.
23. Chen Q, He G, Ali MA. Optimization of medium composition for the production of elastase by Bacillus sp. EL31410 with response surface methodology. Enz Microb Technol 2002; 30(5): 667-672. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00028-5
24. Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. Am J Clin Nutr. 2001; 73(2): 374s-379s.
25. Beukes EM, Bester BH, Mostert JF. The microbiology of South African traditional fermented milks. Int J Food Microbiol. 2001; 63(3): 189-197. doi:10.-1016/S0168-1605(00)00417-7
26. Sathyanarayanan J, Kunthala J, Gurumurthy K. Optimization of MRS media components using response surface methodology for the riboflavin production by *Lactobacillus fermentum* isolated from yoghurt sample. Int Food Res J. 2011; 18(1): 149-158.
27. Ghasemi S, Ahmadzadeh M. Optimisation of a cost-effective culture medium for the large-scale production of Bacillus subtilis UTB96. Arch Phytopathology Plant Prot. 2013; 46(13): 1552-1563. doi: 10.1080/03235408.2013.771469

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2008, p. 5349–5358 Vol. 74, No. 17
0099-2240/08/$08.00+0 doi:10.1128/AEM.00324-08
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Comparative Study of Sugar Fermentation and Protein Expression Patterns of Two *Lactobacillus plantarum* Strains Grown in Three Different Media▽†

Carme Plumed-Ferrer,[1]* Kaisa M. Koistinen,[1]‡ Tiina L. Tolonen,[2] Satu J. Lehesranta,[1]§ Sirpa O. Kärenlampi,[1] Elina Mäkimattila,[3] Vesa Joutsjoki,[3] Vesa Virtanen,[2] and Atte von Wright[1]

Applied Biotechnology, Department of Biosciences, University of Kuopio, FIN-70211 Kuopio, Finland[1]; Laboratory of Biotechnology, University of Oulu, FIN-88600 Sotkamo, Finland[2]; and Biotechnology and Food Research, MTT Agrifood Research Finland, FIN-31600 Jokioinen, Finland[3]

Received 7 February 2008/Accepted 12 June 2008

A comparative study of two strains of *Lactobacillus plantarum* (REB1 and MLBPL1) grown in commercial medium (MRS broth), cucumber juice, and liquid pig feed was performed to explore changes to the metabolic pathways of these bacteria, using a proteomics approach (two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry) combined with analyses of fermentable sugars and fermentation end products. The protein expression showed that even with an excess of glucose in all media, both strains could metabolize different carbohydrates simultaneously and that hexoses could also be used via a phosphoketolase pathway with preferential expression in liquid feed. Sugar analyses showed that the fermentation of sugars was homolactic for all media, with some heterolactic activity in liquid feed, as shown by the production of acetate. Cucumber juice (the medium with the highest glucose content) showed the lowest hexose consumption (10%), followed by liquid feed (33%) and MRS broth (50%). However, bacterial growth was significantly higher in cucumber juice and liquid feed than in MRS broth. This discrepancy was due to the growth benefit obtained from the utilization of the malate present in cucumber juice and liquid feed. Despite different growth conditions, the synthesis of essential cellular components and the stress response of the bacteria were unaffected. This study has improved our understanding of the mechanisms involved in the growth performance of an appropriate lactic acid bacterium strain to be used for food and feed fermentation, information that is of crucial importance to obtain a high-quality fermented product.

Lactic acid bacteria (LAB) represent a group of microorganisms that are functionally related by their ability to produce lactic acid during fermentation. Acidification due to lactic acid production and other enzymatic processes contribute to the flavor, texture, and keeping qualities of fermented food and feed products (2, 14). Understanding the mechanisms involved in the growth performance of an appropriate LAB strain to be used for food and feed fermentations is of crucial importance to obtaining high-quality fermented product.

Lactobacillus plantarum is a facultative heterofermentative LAB encountered in a large number of environmental niches, from dairy and meat products to a variety of vegetable and plant fermentations (8). It is also one of the *Lactobacillus* species present in the human intestinal tract (1). Due to its high acid tolerance, *L. plantarum* has been used as the starter culture of food and feedstuffs (16, 24), but it has also been used as a probiotic (6, 12) and as a delivery vehicle for therapeutic compounds (14, 18) due to its ability to survive and persist in the gastrointestinal tract. Therefore, studies of the adaptation of *L. plantarum* to different environmental niches are of great interest due to the extensive use of this bacterium in food and feed fermentations.

The two strains of *L. plantarum* used in this study (REB1 and MLBPL1 strains) are used in starter cultures for sauerkraut, cucumber juice, and liquid pig feed fermentations (16, 20). In our previous study of the growth phase-dependent proteomes of *L. plantarum* strains REB1 and MLBPL1 grown in MRS broth, the growth phase-dependent preferential expression of the different metabolic pathways was elucidated (9). A similar study has also been performed with *L. plantarum* WCFS1 grown in MRS broth (4). Summing up the general findings of these two studies, the bacteria created a pool of acetyl phosphate and nucleotides during the lag phase and activated a stress response; during the early exponential phase, the bacteria showed preferential expression of proteins for the simultaneous use of different carbohydrates; during the late exponential and early stationary phases, the bacteria showed preferential expression for enzymes involved in the biosynthesis of proteins and cell division pathways and for membrane proteins; and during the late stationary phase, preferential expression was shown for numerous stress proteins (4, 9). The indicated simultaneous use of different carbohydrates in the early exponential phase was very interesting because these results contradict the standard view of carbohydrate metabo-

* Corresponding author. Mailing address: Applied Biotechnology, Department of Biosciences, University of Kuopio, P.O. Box 1627, FIN-70211 Kuopio, Finland. Phone: 358 16173573. Fax: 358 17163322. E-mail: Carme.Plumed@uku.fi.

‡ Present address: School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey TW20 0EX, United Kingdom.

§ Present address: Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, FI-00014 Helsinki, Finland.

† Supplemental material for this article may be found at http://aem.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 20 June 2008.

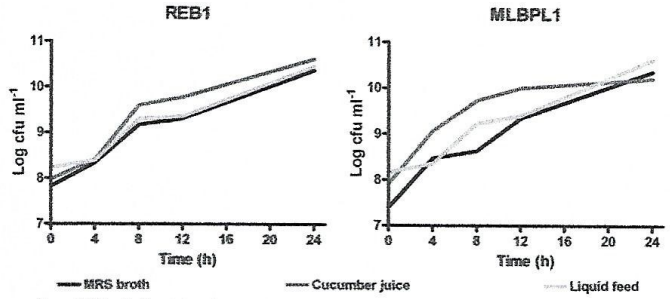


FIG. 1. Growth curves (log CFU ml^{-1}) of *L. plantarum* strains REB1 and MLBPL1 in MRS broth, cucumber juice, and liquid feed.

lism in LAB, according to which, glucose represses the proteins associated with the metabolism of other sugars (8, 22).

Previous proteomic studies of *L. plantarum* have been performed using MRS broth, the standard rich medium used for laboratory cultivations. However, MRS broth cannot be considered a representative medium from which conclusions can be made about gene expression under actual conditions of applications of *L. plantarum* to food and feed fermentations. In this study, the protein expression patterns of *L. plantarum* strains REB1 and MLBPL1 were investigated with media (cucumber juice and liquid pig feed) that are relevant to the practical fermentation processes in which these strains are actually used as starters, and the proteomes were compared to those seen after growth in MRS medium. The aim was to find out the application-specific proteomic patterns and whether strains with different backgrounds displayed any specific adaptation to the respective fermentation media.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria and their cultivation. The *L. plantarum* strain REB1 was isolated from a spontaneously fermented cereal-based feed (17), and the *L. plantarum* strain MLBPL1 was isolated from a spontaneously fermented white cabbage (20). A 2% overnight aerobic culture in MRS broth (Lab M, Lancashire, United Kingdom) was used to inoculate the experimental media (MRS broth, cucumber juice, and liquid pig feed). Cultures (25 ml) from the MRS broth and cucumber juice and 50-ml cultures from liquid pig feed were aerobically incubated at 30°C with slow agitation. Five independent cultures were made from each strain and medium. Samples were taken after 8 h of incubation, corresponding to the exponential growth phase of all cultures, as shown by the growth behavior of both strains (Fig. 1). The bacterial count of each sample at 8 h was determined by plating on MRS agar (Lab M, Lancashire, United Kingdom). Liquid pig feed and cucumber juice samples were subsequently filtered (Nylon filter; 11-μm pore size; Millipore, Billerica, MA). Bacteria were pelleted (3,000 × *g* for 5 min at 4°C) and frozen immediately in liquid N_2. Samples were stored at −70°C and used later for proteomics and sugar analyses.

Experimental media. The experimental media used in this study were MRS broth, cucumber juice, and liquid pig feed. Approximately 400 ml of cucumber juice was obtained by homogenizing and centrifuging one Finnish cucumber (500 g). Cucumber juice was inoculated with 2% glucose and subsequently autoclaved at 121°C for 5 min. Liquid pig feed was prepared by mixing the dry feed with three parts water. The dry feed was formulated as described by Plumed-Ferrer et al. (16). Briefly, dry feed contained 69% barley, 12.8% soybean meal, 18% concentrated liquid whey, and 0.2% mineral vitamin premix.

Extraction of soluble proteins. Extraction of soluble proteins was performed as described by Koistinen et al. (9). Briefly, the frozen bacterial pellets were washed and lysed with lysozyme at 37°C for 45 min. Subsequently, DNase treatment was performed, and after the lysate was centrifuged, the supernatants were collected, and the proteins were precipitated in ice-cold acetone with trichloroacetic acid. After the protein pellets were washed with ice-cold acetone, they were dried and stored at −70°C.

Two-dimensional electrophoresis. One two-dimensional electrophoresis (2-DE) gel was run for each biological replicate. The 2-DE was performed as described by Koistinen et al. (9). Briefly, the proteins were resuspended and solubilized, and the protein concentrations were calculated using a protein assay dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA). For isoelectric focusing, 24-cm immobilized pH gradient (IPG) strips with a linear pH range of 4 to 7 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) were used. The focusing was done in an Ettan IPGPhor system (Amersham Biosciences), and the strips were subsequently stored at −70°C. The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel was run overnight with 19- by 23-cm homogeneous 12% gels in a Hoefer DALT system (Amersham Biosciences). The gels were stained with SYPRO Ruby (Bio-Rad), and gel images were acquired with an FLA-3000 fluorescent image analyzer (Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Gel image analysis and statistical analysis. Image analyses were performed with PDQuest software (Bio-Rad). Spot intensities were normalized to the total intensity of valid spots (which, by default, expresses normalized values as parts per million) to minimize errors caused by differences among the amounts of proteins and staining intensities. In the case of strain REB1, the majority of spots with normalized quantity values of ≤7.1389 had a quality score of 0, as given by PDQuest, and spots were considered background noise, while spots with normalized quantity values of >7.1389 tended to have quality scores of >0. For data derived from the MLBPL1 strain, spots with normalized quantity values of ≤3.4053 were set to 0. Differences among spot intensities from the different growth media were analyzed statistically with the nonparametric Kruskal-Wallis test and principal component analysis (PCA), using SPSS software (SPSS, Chicago, IL). The criteria for differential expression were as follows: protein expression levels in different media were first compared using the Kruskal-Wallis test. When there was an indication of a statistically significant ($P < 0.01$) difference, the expression patterns were checked visually to observe in which medium the spot intensity differed from the others. Furthermore, PCA was used to assess whether the samples of bacteria grown in different media would separate from each other, based on their protein expression patterns, and to identify groups of

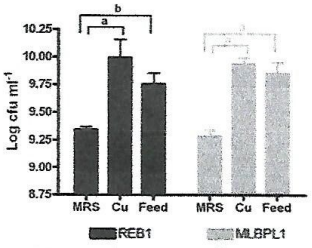


FIG. 2. Bacterial growth (log CFU ml^{-1}) after 8 h of incubation. MRS, MRS broth; Cu, cucumber juice; Feed, liquid pig feed. Groups with different letters differ significantly: a, $P < 0.01$; b, $P < 0.05$.

TABLE 1. Identified proteins with the most statistically significant differences in their expression in *L. plantarum* REB1[a]

Characteristic	Function	Spot no.	Gene name	Accession no.	Protein name	Protein expression levels relative to MRS (mean no. of spots ± SEM)[b]		
						MRS	Cucumber	Feed
Spots with low expression in feed	Carbohydrate metabolism	R064	*ldhL1*	P56512	L-Lactate dehydrogenase	1.00 ± 0.11	0.61 ± 0.08	0.31 ± 0.05
		R107	*dxs*	Q88UA0	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	1.00 ± 0.12	1.48 ± 0.10	0.37 ± 0.08
	Nucleotide metabolism	R102	*adeC*	Q88SR1	Adenine deaminase	1.00 ± 0.10	2.58 ± 0.12	ND
		R091	*purA*	Q88SV6	Adenylosuccinate synthase	1.00 ± 0.12	1.39 ± 0.09	0.08 ± 0.01
		R100	*purH*	Q88U29	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	1.00 ± 0.23	5.63 ± 0.62	0.18 ± 0.11
		R025	*pyrAA*	P77885	Carbamoyl-phosphate synthase	1.00 ± 0.08	0.44 ± 0.13	ND
		R026	*pyrE*	P77889	Orotate phosphoribosyltransferase	1.00 ± 0.16	0.17 ± 0.06	ND
	Amino acid metabolism	R085	*dapF*	Q88V90	Diaminopimelate (DAP) epimerase	1.00 ± 0.08	1.71 ± 0.13	0.67 ± 0.06
		R087	*msrA2*	Q88W34	Protein-methionine-*S*-oxide reductase	1.00 ± 0.20	3.35 ± 0.69	0.30 ± 0.10
		R103	*glyA*	Q88UT5	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)	1.00 ± 0.07	2.06 ± 0.10	0.72 ± 0.04
	DNA metabolism, transcription and translation	R051	*recA*	Q88UZ4	Recombinase A	1.00 ± 0.06	0.71 ± 0.04	0.27 ± 0.02
		R055	*gatA*	Q88XP7	Glutamyl-tRNA amidotransferase, subunit A	1.00 ± 0.07	0.71 ± 0.11	0.18 ± 0.04
	Stress proteins and proteins with general or unknown function	R075	*gshR4*	Q88SV9	Glutathione reductase	1.00 ± 0.06	0.37 ± 0.08	0.09 ± 0.03
		R131	*gshR2*	Q88XF4	Glutathione reductase	1.00 ± 0.02	0.88 ± 0.05	0.39 ± 0.04
		R098	*npr2*	Q88UF0	NADH peroxidase	1.00 ± 0.06	1.68 ± 0.07	0.82 ± 0.03
		R088		Q88TC6	Short-chain dehydrogenase/oxidoreductase	1.00 ± 0.11	2.22 ± 0.16	0.25 ± 0.03
		R096		Q88Z51	Hypothetical protein	1.00 ± 0.05	2.31 ± 0.07	0.59 ± 0.11
Spots with high expression in feed	Amino acid metabolism	R049	*metK*	Q88XB8	Methionine adenosyltransferase	1.00 ± 0.09	0.60 ± 0.04	1.76 ± 0.12
	Stress proteins and proteins with general or unknown function	R109	*hslO*	Q88Z30	33-kDa chaperonin (heat shock protein 33 homolog)	1.00 ± 0.19	1.63 ± 0.07	2.21 ± 0.20
Spots with differences among all three media	Carbohydrate metabolism	R090	*mleS*	Q88XR8	Malolactic enzyme	1.00 ± 0.20	23.88 ± 5.18	11.50 ± 0.91
		R091	*pmi*	Q88US8	Mannose-6-phosphate isomerase	1.00 ± 0.08	1.56 ± 0.08	1.20 ± 0.03
		R127	*tpiA*	Q88YH4	Triosephosphate isomerase (TIM)	1.00 ± 0.09	0.28 ± 0.06	0.44 ± 0.05
		R137	*gapB*	Q88YH6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.00 ± 0.17	0.27 ± 0.04	0.45 ± 0.07
		R036	*pts9AB*	Q88ZD6	Mannose PTS, EIIAB	1.00 ± 0.07	0.39 ± 0.12	1.21 ± 0.08
	Nucleotide metabolism	R101	*purH*	Q88U29	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	1.00 ± 0.11	2.55 ± 0.14	0.55 ± 0.08
		R106	*pyrAA*	P77885	Carbamoyl-phosphate synthase	1.00 ± 0.28	4.73 ± 0.86	1.59 ± 0.33
	Amino acid metabolism	R086	*dapF*	Q88V90	DAP epimerase	1.00 ± 0.16	3.00 ± 0.77	ND
	DNA metabolism, transcription, and translation	R139	*ccpA*	Q88V30	Catabolite control protein A	1.00 ± 0.06	0.54 ± 0.02	0.85 ± 0.03
		R079		Q88X73	Transcription regulator	1.00 ± 0.36	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01
		R130	*tsf*	Q88VJ5	Elongation factor Ts	1.00 ± 0.32	ND	ND
		R007				1.00 ± 0.18	0.13 ± 0.06	0.36 ± 0.07
	Stress proteins and proteins with general or unknown function	R043	*hpr*	Q88XD9	Phospho carrier protein Hpr	1.00 ± 0.15	0.10 ± 0.06	ND
		R140	*luxS*	Q88YI6	*S*-Ribosylhomocysteine lyase (AI-2)	1.00 ± 0.12	0.18 ± 0.09	ND
Other spots with significant differences between growth media	Peptidoglycan biosynthesis	R006	*ddl*	Q88UV8	D-Alanine-D-alanine ligase	1.00 ± 0.03	0.82 ± 0.07	1.12 ± 0.03
		R132				1.00 ± 0.07	0.60 ± 0.03	0.81 ± 0.04
		R124	*murC*	Q88WZ5	UDP-*N*-acetylmuramate-L-alanine ligase	1.00 ± 0.05	0.68 ± 0.05	1.18 ± 0.04
	DNA metabolism, transcription and translation	R119	*dnaN*	Q890K7	DNA-directed DNA polymerase III, beta chain	1.00 ± 0.03	0.59 ± 0.06	1.16 ± 0.06
		R113	*gatB*	Q88XP6	Glutamyl-tRNA amidotransferase, subunit B	1.00 ± 0.02	0.81 ± 0.02	1.10 ± 0.02

[a] Statistical differences were significant at a P value of <0.005.

[b] The quantities of the spots in each growth phase are shown as the means ± standard error of the means (SEM). Quantities are scaled to set the average quantity in MRS to 1. ND, not detected.

proteins responsible for the differences observed between media. Spots with at least five non-0 values were included in PCA. For PCA, the quantity values were transformed to square roots to normalize the data. Moreover, one-way analysis of variance and Tukey's honestly significant difference post hoc test were used to analyze the differences between the bacterial growth in each medium, using SPSS software.

Mass spectrometry identification of proteins. SYPRO Ruby-stained 2-DE gels were restained with silver, using a mass spectrometry-compatible method (19), with the modification that the gels were washed first in 40% ethanol and 5% acetic acid and then washed twice in water for 30 min. Matches with confidence intervals of 95% were selected, and each match was verified manually to increase the reliability of the identification. Tryptic digestion of the protein spots excised from the gels and sample preparation was performed according to the method described by Koistinen et al. (10).

The tryptic peptides were analyzed with one of two different liquid chromatography-tandem mass spectrometry systems, as described by Lehesranta et al.

TABLE 2. Identified proteins with the most statistically significant differences in their expression in *L. plantarum* MLBPL1[a]

Characteristic	Function	Spot no.	Gene name	Accession no.	Protein name	Protein expression levels relative to MRS (mean no. of spots ± SEM)[b]		
						MRS	Cucumber	Feed
Spots with differences among all three media	Carbohydrate metabolism	M007	*fba*	Q88ZI6	Fructose bisphosphate aldolase	1.00 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.66 ± 0.03
		M110				1.00 ± 0.21	0.11 ± 0.03	0.35 ± 0.04
		M111				1.00 ± 0.12	0.12 ± 0.02	0.38 ± 0.05
		M004	*ldhD*	Q88VJ2	D-Lactate dehydrogenase	1.00 ± 0.05	1.15 ± 0.03	0.58 ± 0.05
	Nucleotide metabolism	M116	*purC*	Q88U22	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide (SAICAR) synthetase	1.00 ± 0.11	0.09 ± 0.03	ND
		M050	*purK1*	Q88U21	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit	1.00 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.03 ± 0.00
		M022	*pyrAA*	P77885	Carbamoyl-phosphate synthase	1.00 ± 0.06	0.45 ± 0.09	ND
		M100				1.00 ± 0.07	2.15 ± 0.09	0.09 ± 0.01
		M020	*pyrD*	P77887	Dihydroorotate oxidase	1.00 ± 0.03	1.39 ± 0.12	ND
		M019	*pyrE*	P77889	Orotate phosphoribosyltransferase	1.00 ± 0.13	0.52 ± 0.12	ND
	Amino acid metabolism	M112	*metC1*	Q88ZQ3	Cystathionine beta-lyase	1.00 ± 0.13	0.29 ± 0.03	ND
		M084	*cysK*	Q88ZQ2	Cysteine synthase	1.00 ± 0.08	0.16 ± 0.03	ND
		M097	*glyA*	Q88UT5	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)	1.00 ± 0.08	1.82 ± 0.26	0.42 ± 0.05
	Peptidoglycan biosynthesis	M105	*glnA*	Q88WP3	Glutamate-ammonia ligase	1.00 ± 0.08	1.61 ± 0.11	1.93 ± 0.04
	Peptidases	M088	*pepP*	Q88WN2	XAA-Pro aminopeptidase (putative)	1.00 ± 0.13	4.72 ± 0.25	3.08 ± 0.25
	Stress proteins and proteins with general or unknown function	M120	*atpA*	Q88UU1	H^+-transporting two-sector ATPase, gamma subunit	1.00 ± 0.21	ND	ND
		M114	*luxS*	Q88YI6	*S*-Ribosylhomocysteine lyase (AI-2)	1.00 ± 0.20	0.31 ± 0.11	0.01 ± 0.01
Spots with high levels in cucumber	Carbohydrate metabolism	M089	*mleS*	Q88XR8	Malolactic enzyme	1.00 ± 0.31	14.96 ± 1.90	6.62 ± 1.54
		M090				1.00 ± 0.27	18.27 ± 3.55	8.24 ± 0.86
	Nucleotide metabolism	M028	*purA*	Q88SV6	Adenylosuccinate synthase	1.00 ± 0.03	1.23 ± 0.06	0.10 ± 0.01
		M101	*purH*	Q88U29	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	1.00 ± 0.10	1.61 ± 0.14	0.19 ± 0.01
		M102				1.00 ± 0.09	1.77 ± 0.21	0.04 ± 0.04
	DNA metabolism, transcription and translation	M092	*gatA*	Q88XP7	Glutamyl-tRNA amidotransferase, subunit A	1.00 ± 0.10	2.46 ± 0.10	0.60 ± 0.06
	Peptidases	M055	*guaA*	Q88Y74	Cysteine aminopeptidase	1.00 ± 0.06	3.07 ± 0.36	1.72 ± 0.09
	Stress proteins and proteins with general or unknown function	M098	*npr2*	Q88UF0	NADH peroxidase	1.00 ± 0.08	2.29 ± 0.25	1.41 ± 0.11
		M091		Q88TC6	Short-chain dehydrogenase/oxidoreductase	1.00 ± 0.06	1.30 ± 0.07	0.04 ± 0.03
Spots with low levels in cucumber	Carbohydrate metabolism	M121	*mae*	Q88XY0	Malic enzyme, NAD-dependent	1.00 ± 0.25	ND	0.07 ± 0.07
		M051	*mtlD*	Q88ZS1	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	1.00 ± 0.06	0.27 ± 0.02	1.46 ± 0.06
	Lipid biosynthesis	M118	*plsX*	Q88WK2	Fatty acid/phospholipid synthesis protein	1.00 ± 0.13	0.33 ± 0.11	0.53 ± 0.03
	Stress proteins and proteins with general or unknown function	M117		Q88Y10	Metal-dependent regulator	1.00 ± 0.09	0.14 ± 0.07	0.45 ± 0.05
Other spots with significant differences between growth media	Stress proteins and proteins with general or unknown function	M058	*clpE*	Q88XE0	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpE	1.00 ± 0.06	0.24 ± 0.03	0.46 ± 0.09

[a] Statistical differences were significant at a P value of <0.005.

[b] The quantity of the spots in each growth phase are shown as the means ± standard error of the means (SEM). Quantities are scaled to set the average quantity in MRS to 1. ND, not detected.

(11). The peptides were identified against the *L. plantarum* genome (8) or the complete proteome in UniProtKB or the NCBI nonredundant protein database or the known proteins from lactobacilli. Matches between tandem mass spectrometry spectra and sequences in the databases were verified manually.

Sugar, organic acids, and ethanol analyses. Sugars and organic acids (three replicates) were determined with a high-performance liquid chromatography (1100 series machine; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) system equipped with a diode array detector and a refractive index detector. For the analysis of disaccharides, thawed samples were centrifuged (13,000 × *g*; 10 min; 20°C), filtered through a 0.45-μm syringe filter (Palm Gelman Laboratory, New York, NY), and analyzed with a Zorbax carbohydrate column (250-mm by 4.6-mm inside diameter [ID]; 5 μm; Agilent Technologies), and eluted with 1.4 ml min^{-1} of 80% acetonitrile. We analyzed monosaccharides and organic acids by mixing aliquots of 500 μl of thawed samples with 20 μl of 7% sulfuric acid and then diluting the samples twofold with distilled water. The mixtures were subsequently centrifuged (13,000 × *g*; 10 min; 20°C), filtered through a 0.45-μm syringe filter (Palm Gelman Laboratory), and analyzed with a Rezex RHM-monosaccharide H^+ column (8%) (300-mm by 7.8-mm ID; 8 μm; Phenomenex Inc., Torrance, CA), eluted with 0.4 ml min^{-1} of 0.5 mM sulfuric acid. Standard solutions of glucose, fructose, galactose, lactose, sucrose, lactic acid, malic acid, and acetic acid were used as external standards for quantification.

Gas chromatography (HP6890GC model; Agilent Technologies) coupled to a mass-selective detector (HP5973 machine; Agilent Technologies) was used to determine the amount of ethanol in the culture samples. Separation of ethanol from the other compounds was achieved with an HP-FFAP column (25-mm by 0.20-mm ID; 0.30 μm; Agilent Technologies) and helium as the carrier gas. Samples (1 μl) were injected using the split mode (200:1) at 250°C, and compounds were separated using the following temperature gradient program: 60°C for 2 min, 15°C/min to 200°C, and postrun at 220°C for 2 min. Quantification was accomplished using the selected ion-monitoring mode, with ethanol as the external standard.

RESULTS

Growth of *L. plantarum* REB1 and MLBPL1 in different media. The colony counts for *L. plantarum* REB1 and MLBPL1 in MRS broth, cucumber juice, and liquid feed were calculated at the moment the bacteria were collected (Fig. 2). The results showed that the colony counts for both strains were significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$, respectively) higher in cucumber juice and liquid feed than in MRS broth (Fig. 2). The cell counts for the REB1 strain were slightly but not significantly higher than that of the MLBPL1 strain ($P > 0.05$).

Protein expression patterns of *L. plantarum* strains REB1 and MLBPL1. Five biological replicates of each strain and medium were analyzed, and one 2-DE gel was run for each biological replicate. The representative 2-DE gels of the two *L. plantarum* strains are shown in Fig. SM1 and SM2 in the supplemental material; and the numbers shown correspond to the identified proteins listed in Tables 1 and 2, as well as in Tables SM3 to SM5 in the supplemental material. The number of protein spots quantified from the gels was 924 (REB1 strain) and 905 (MLBPL1). A total of 232 proteins were identified. Of these proteins, 80 and 55 protein spots from REB1 and MLBPL1, respectively, showed statistically significant differences between media ($P < 0.01$). Some additional spots, which did not show statistically significant differences ($P > 0.01$) between media, were identified because of their high intensities. In a few cases, different spots from the same *L. plantarum* strain were identified as the same protein, suggesting the presence of different isoforms. Several protein spots yielded more than one protein identification with high confidence, indicating the presence of comigrating proteins or proteins sharing the same sequence (although the latter was not the case in this experiment). These proteins were excluded because the quantitative expression of the two comigrating proteins could not be measured reliably. Classification of the proteins was done according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (7) and to LacplantCyc, a *L. plantarum* pathway/genome database used as a reference for LAB (21).

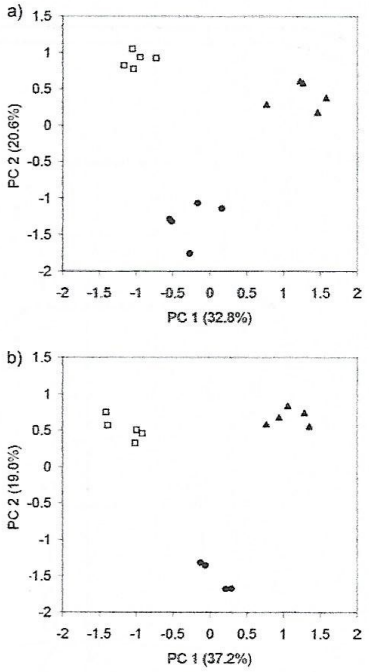


FIG. 3. Principal component (PC) scores for the *L. plantarum* strains REB1 (a) and MLBPL1 (b) grown in MRS broth (□), cucumber juice (●), and liquid pig feed (▲). Values in parentheses indicate the percentages of total variation accounted for by each principal component.

PCA was used to identify groups of proteins responsible for the differences observed between media. Samples of bacteria grown in the three media could be separated very clearly, with some differences shown between the two strains (Fig. 3). Several proteins that had a high positive or negative loading in the PCs, i.e., those that contributed to the differences seen for the components, were identified. For the REB1 strain, samples grown in liquid feed separated from those in the MRS broth and cucumber juice in the first component (PC1), whereas all three media separated from each other in the second component (PC2). The protein spots with high positive loading in the PC1 tended to be highly expressed (e.g., R049), and spots with high negative loadings tended to be expressed at low levels in liquid feed (e.g., R064) (Table 1; see also Table SM3 in the supplemental material). For the MLBPL1 strain, all three media separated from each other in the PC1, whereas samples grown in cucumber juice separated from those grown in MRS broth and liquid feed samples in the PC2. In this case, the protein spots with high positive loading in the PC2 tended to be expressed at low levels (e.g., M121), and spots with high negative loading tended to be highly expressed in cucumber

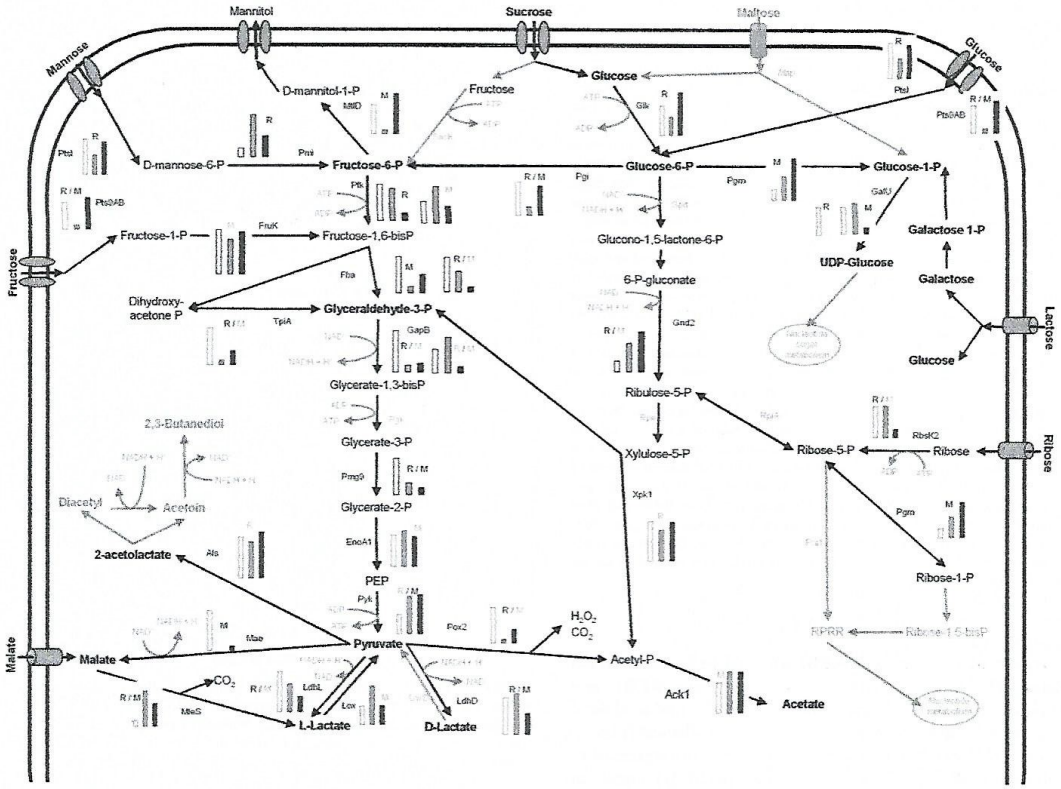


FIG. 4. Carbohydrate pathways used by *L. plantarum* strains REB1 and MLBPL1. Expression of the identified enzymes that catalyze the different steps is indicated by white (MRS), gray (cucumber), and black (feed) bars. The strain and statistical significance of each protein pattern is indicated by R (REB1) or M (MLBPL1) and by black ($P < 0.01$) or gray ($P > 0.01$). Abbreviations: Ack1, acetate kinase; Als, acetolactate synthase; EnoA1, enolase 1; Fba, fructose bisphosphate aldolase; FruK, 1-phosphofructokinase; GalU, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase; GapB, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glk, glucokinase; Gnd2, phosphogluconate dehydrogenase; Gpd, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase; LdhD, D-lactate dehydrogenase; LdhL1, L-lactate dehydrogenase; Lox, lactate oxidase; LoxD, lactate oxidase (oxidoreductase); Mae, malic enzyme; Map, maltose phosphorylase; MleS, malolactic enzyme; MtlD, mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase; Pfk, 6-phosphofructokinase; Pgi, glucose-6-phosphate isomerase; Pgk, phosphoglycerate kinase; Pgm, phosphoglucomutase; Pmg9, phosphoglyceromutase 2; Pmi, mannose-6-phosphate isomerase; Pox2, pyruvate oxidase; Prs1, ribose-phosphate pyrophosphokinase; Pts9AB, mannose PTS, EIIAB; PtsI, phosphoenolpyruvate–protein phosphatase; Pyk, pyruvate kinase; RbsK2, ribokinase; Rpe, ribulose-phosphate 3-epimerase; RpiA, ribose 5-phosphate isomerase A; Sack, fructokinase; TpiA, triosephosphate isomerase; Xpk1, phosphoketolase.

juice (e.g., M089) (Table 2; see also Table SM4 in the supplemental material). The two components accounted for 53.4% and 56.2% of the variation between the growth media used for the REB1 and MLBPL1 strains, respectively.

Proteins differentially expressed between the media and strain. Eighty protein spots from REB1 and 55 spots from MLBPL1 showed statistically significant differences in protein expression between media ($P < 0.01$). Tables 1 and 2 show the most statistically significant differences, and the complete list can be found in Tables SM3 and SM4 in the supplemental material. Data showed that in MRS broth, the identified proteins involved in glycolysis and pyruvate metabolism generally showed the highest expression, except for the enzyme pyruvate kinase proteins, which had the lowest expression in this medium (Fig. 4). The proteins for the de novo synthesis of purines and pyrimidines showed high expression in MRS broth, as well as the enzyme adenine phosphoribosyltransferase, involved in the salvage pathway of purines (Fig. 5a).

Protein expression levels for carbohydrate metabolism in cucumber juice varied considerably (Fig. 4). The proteins for nucleotide synthesis showed expression levels that were comparable to those observed for MRS broth. However, the adenine phosphoribosyltransferase protein expression was found at low levels in cucumber juice. Interestingly, the alpha subunit of an ATPase showed the highest expression in cucumber juice, whereas the gamma subunit showed no expression in this medium (Fig. 5b).

Glycolytic enzymes and those involved in pyruvate metabolism generally showed the lowest expression in liquid feed. However, the phosphotransferases (PTS) protein identified, as

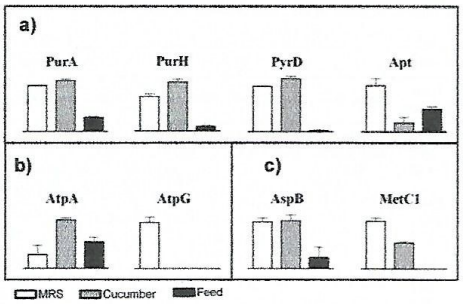


FIG. 5. Expression profiles of some identified proteins. The quantities of the spots in each growth phase are shown as the means of spot quantity ± standard errors of the means. Abbreviations: (a) PurA, adenylosuccinate synthase; PurH, bifunctional purine biosynthesis protein purH; PyrD, dihydroorotate oxidase; Apt, adenine phosphoribosyltransferase; (b) AtpA, H^+-transporting two-sector ATPase, alpha subunit; AtpG, H^+-transporting two-sector ATPase, gamma subunit; (c) AspB, aspartate aminotransferase; MetC1, cystathionine beta-lyase.

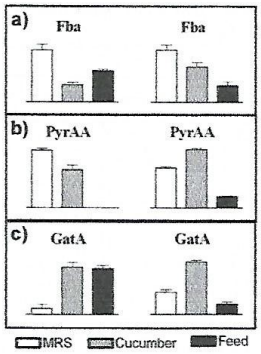


FIG. 6. Expression profiles of some identified proteins for which two isoforms of the same protein showed different expression patterns. The quantities of the spots in each growth phase are shown as the means of spot quantity ± standard errors of the means. Abbreviations: (a) Fba, fructose bisphosphate aldolase; (b) PyrAA, carbamoyl-phosphate synthase, pyrimidine-specific small chain; (c) GatA, glutamyl-tRNA amidotransferase, subunit A.

well as the enzymes for the first steps of the degradation of hexoses (glucokinase, glucose-6-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, and 1-phosphofructokinase), were highly expressed in liquid feed. The highest expression of the key enzyme for the oxidative branch of the phosphoketolase pathway (phosphogluconate dehydrogenase) was also detected in this medium (Fig. 4). The proteins for nucleotide metabolism showed the lowest expression in this medium compared to that in MRS broth and cucumber juice (Fig. 5a). The expression of enzymes for amino acid metabolism such as aspartate aminotransferase and cystathionine beta-lyase (Fig. 5c) and some proteins involved in DNA metabolism, transcription, and translation was found at low levels in liquid feed.

The expression patterns of the proteins identified from both *L. plantarum* strains were very similar. Generally, the REB1 strain showed more proteins with medium-dependent expression (i.e., more strongly up- and downregulated) than the MLBPL1 strain, which had a similar protein expression pattern but with smaller differences (not significantly different) in expression. Within the same strain, there were also protein isoforms identified at different spots that showed differences in their expression profiles, e.g., isoforms of fructose bisphosphate aldolase showed differential expression in cucumber juice, as well as isoforms of carbamoyl-phosphate synthase (pyrimidine-specific small chain) in MRS broth, and those of glutamyl-tRNA amidotransferase (subunit A) in liquid feed (Fig. 6).

Sugars, organic acids, and ethanol analyses. The total consumption of hexoses (mainly glucose) in MRS broth was 48 mM for the REB1 strain and 55 mM for MLBPL1. The total production of lactic acid was 83 mM and 110 mM for REB1 and MLBPL1, respectively. These results show that approximately 1 mol of hexose was converted to 2 mol of lactic acid, as in a classic homofermentative pattern. Moreover, the production of acetic acid or ethanol was practically nonexistent (Tables 3 and 4).

Cucumber juice is normally supplemented with 2% glucose because of the decrease of sugars when cucumbers are stored. For this reason, the final glucose concentration in cucumber juice was particularly high. However, the total consumption of hexoses, as well as the total lactic acid production, was lower in cucumber juice than in MRS broth. In cucumber juice, the fermentation of hexoses was also mainly homolactic. The production of acetic acid was very low, and even though the results showed that production of acetic acid for REB1 (2.2 mM) was higher than that for MLBPL1 (0.8 mM), the differences were not significant ($P > 0.05$). Cucumber juice contained approximately 14 mM of malic acid, which was completely consumed by both strains. Ethanol was practically undetectable (Tables 3 and 4).

The total consumption of hexoses in liquid feed was approximately 30 mM for both strains, showing consumption that was higher than that in cucumber juice. The production of lactic acid was also higher in liquid feed than in cucumber juice (76 and 87 mM by REB1 and MLBPL1 strains, respectively). The highest concentrations of acetic acid were detected in this medium (8 mM by REB1 and 9 mM by MLBPL1). Liquid feed also contained approximately 8.5 mM of malic acid, which was totally consumed in both strains. No ethanol production was observed (Tables 3 and 4). The fermentation of hexoses in liquid feed was, thus, both homo- and heterolactic.

DISCUSSION

The extensive adaptation capacity of *L. plantarum* to different environments and its wide range of applications make this bacterium especially interesting and challenging. The sequence analysis provided very valuable information, showing that this bacterium's most striking feature was the high potential to import and metabolize a large number of carbohydrates (8). Genomic analysis provides a static view of an organism, whereas proteomic analysis allowed a more dynamic observation and, thus, a more complete picture of the cellular events under conditions approaching the actual applications (e.g., in

TABLE 3. Effects of the growth of *L. plantarum* REB1 on the concentrations of sugars, organic acids, and ethanol in MRS broth, cucumber juice, and liquid feed

Medium	Time (h)[a]	Concn (mM ± SD) in the medium[b]											% of hexose utilization
		Glucose[c]	Fructose	Lactose	Sucrose	Galactose	Total sugars	Total hexoses	Lactic acid	Acetic acid	Malic acid	Ethanol	
MRS	0	79.6 ± 0.6	14.7 ± 0.2	2.6 ± 0.3	4.0 ± 2.0	ND	101	107.6	ND	82.8 ± 0.3	ND	ND	
	8	51.1 ± 0.5	ND	1.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	3.2 ± 0.1	57	59.7	82.6 ± 0.7	83.0 ± 0.8	ND	ND	
	Δ	−28.5	−14.7	−1.7	−2.2	3.2	−43.9	−47.8	82.6	0.2			44.50
Cucumber juice	0	167.1 ± 2.4	66.0 ± 0.9	ND	ND	3.6 ± 0.0	236.7	236.7	ND	33.4 ± 0.5	13.7 ± 0.1	ND	
	8	152.6 ± 1.2	63.2 ± 0.5	ND	ND	3.5 ± 0.0	219.4	219.4	41.9 ± 0.7	35.6 ± 0.4	ND	ND	
	Δ	−14.5	−2.8			0	−17.3	−17.3	41.9	2.2	−13.7		7.30
Liquid feed	0	13.9 ± 2.6	13.7 ± 2.2	22.8 ± 0.6	11.4 ± 1.2	ND	61.8	96.1	6.6 ± 0.2	ND	7.9 ± 0.9	0.5 ± 0.1	
	8	14.5 ± 1.1	20.0 ± 1.4	15.1 ± 0.4	ND	ND	49.6	64.7	82.5 ± 1.8	8.11 ± 0.3	ND	0.5 ± 0.1	
	Δ	0.6	6.3	−7.7	−11.4		−12.2	−31.4	75.8	8.1	−7.9	0	32.70

[a] Δ, change in concentration.
[b] SD, standard deviation. ND, not detected.
[c] The concentration of glucose was lower than that declared by the manufacturer (111 mM) due to the autoclaving of the medium.

food and feed fermentations). Proteomic analysis was, therefore, chosen to check the changes on the metabolic routes of two *L. plantarum* strains of different origin, grown in two media of diverse composition or in a standard rich medium (MRS broth). The bacteria were collected at the exponential phase, during which the metabolism indicated by the soluble proteome is most versatile, as shown in previous studies (4, 9).

Sugar metabolism. The main quality of LAB is the efficient fermentation of different carbohydrates and related compounds linked to the synthesis of ATP by substrate level phosphorylation. The ATP produced is subsequently used for biosynthetic purposes (2). *L. plantarum* is a facultative heterofermentative bacterium, indicating that hexoses are fermented via glycolysis and pentoses via the phosphoketolase pathway, leading to homo- or heterolactic fermentation, respectively (2). However, under stress conditions, the fermentation of hexoses via the phosphoketolase pathway by *L. plantarum* has been reported (15). In the study reported herein, two strains of *L. plantarum* were grown in three considerably different media of variable sugar composition. MRS broth contained mainly glucose, cucumber juice contained glucose and fructose, and liquid feed had a more complex carbohydrate composition, in which lactose was the predominant sugar (Tables 3 and 4). In all three media, the fermentation of sugars was primarily homolactic. However, some heterolactic activity was detected in liquid feed, indicated by the production of acetic acid after fermentation.

The expression of proteins for the sugar metabolism was generally rather variable. The highest expression of glycolytic proteins occurred in MRS broth and the lowest in liquid feed. Interestingly, the phosphotransferase systems identified showed the highest expression in MRS broth and liquid feed, as did the enzymes for the first steps of degradation of hexoses (Fig. 4). These expression levels correlate with the total hexose consumption, which was the lowest in cucumber juice (roughly 10%, compared with 50% in MRS broth and 33% in liquid feed) (Tables 3 and 4). Despite the low sugar consumption, the growth of both *L. plantarum* strains was significantly higher ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) in cucumber juice than in MRS broth and liquid feed (Fig. 2). This discrepancy between sugar consumption and growth could be explained by the decarboxylation of malate. It is known that the cofermentation of malic acid with another carbohydrate such as glucose increases biomass yield and lactic acid production more than fermentation of glucose alone (2, 13). Thus, the consumption of malic acid in cucumber juice (and to a minor degree in liquid feed) gave the bacteria

TABLE 4. Effects of the growth of *L. plantarum* MLBPL1 on the concentrations of sugars, organic acids, and ethanol in MRS broth, cucumber juice, and liquid feed

Medium	Time (h)[a]	Concentration (mM ± SD) in the medium[b]											% of hexose utilization
		Glucose[c]	Fructose	Lactose	Sucrose	Galactose	Total sugars	Total hexoses	Lactic acid	Acetic acid	Malic acid	Ethanol	
MRS	0	80.9 ± 0.7	14.8 ± 0.1	3.0 ± 1.7	1.0 ± 1.7	ND	99.7	103.7	ND	84.4 ± 0.7	ND	ND	
	8	40.8 ± 1.1	ND	1.8 ± 0.2	1.1 ± 1.3	2.2 ± 0.0	45.8	48.8	109.7 ± 0.8	85.1 ± 0.7	ND	ND	
	Δ	−40.1	−14.8	−1.3	0.1	2.2	−53.9	−55.0	109.7	0.7			53.00
Cucumber juice	0	168.2 ± 5.6	66.4 ± 2.2	ND	ND	3.6 ± 0.1	238.2	238.2	0	33.8 ± 1.1	13.7 ± 0.4	ND	
	8	146.2 ± 2.4	60.9 ± 1.0	ND	ND	3.4 ± 0.0	210.6	210.6	44.7 ± 0.6	34.6 ± 0.6	ND	ND	
	Δ	−22.0	−5.5			−0.2	−27.6	−27.6	44.7	0.8	−13.7		11.60
Liquid feed	0	12.4 ± 2.4	12.2 ± 2.5	20.9 ± 1.9	9.4 ± 2.3	ND	54.9	85.2	6.2 ± 0.5	ND	7.0 ± 0.9	0.6 ± 0.1	
	8	11.6 ± 1.6	16.8 ± 1.9	14.0 ± 1.3	ND	ND	42.4	56.4	93.2 ± 3.7	8.8 ± 1.0	ND	0.6 ± 0.1	
	Δ	−0.8	4.7	−6.9	−9.4		−12.5	−28.8	87.1	8.8	−7.0	0.1	33.80

[a] Δ, change in concentration.
[b] SD, standard deviation. ND, not detected.
[c] The concentration of glucose was lower than that declared by the manufacturer (111 mM) due to the autoclaving of the medium.

a growth benefit over that of the bacteria grown solely on carbohydrates. This is supported by the expression of the malolactic enzyme, which showed the highest expression in cucumber juice, followed by expression in liquid feed (Fig. 4).

The highest expression of 6-phosphogluconate dehydrogenase, the key enzyme from the oxidative branch of the phosphoketolase pathway, occurred in liquid feed, followed by that in cucumber juice. These results suggest that both of the *L. plantarum* strains examined here can oxidize hexoses via the phosphoketolase pathway, as reported previously for *L. plantarum* (15) and as concluded in our previous study of the growth phase-dependent proteome of these two strains (9). Moreover, degradation of hexoses via the phosphoketolase pathway appeared to be medium dependent, suggesting that the combination of different sugars in a medium may influence the pathway used for the degradation of hexoses. Expression of the enzyme ribokinase was highest in MRS broth and cucumber juice, whereas expression levels of the phosphoketolase enzyme were very similar in all three media. These results suggest that the riboses generated in the phosphoketolase pathway in MRS broth and cucumber juice were most likely used for nucleotide synthesis rather than for energy production. This is supported by the fact that the proteins for nucleotide synthesis (purines and pyrimidines) also showed preferential expression in MRS broth and cucumber juice (see Table SM5 in the supplemental material).

In all three media, the major monosaccharide was glucose, and it was still in excess at the time point at which bacteria were harvested. In liquid feed, the preferred sugars appeared to be sucrose and lactose, the breakdown of which contributed to the net increase of glucose and fructose during fermentation. No accumulation of galactose was seen, indicating that this breakdown product of lactose was also consumed rapidly. Moreover, there was some indication of heterolactic fermentation in liquid feed, which is contrary to the expectation that glucose is the preferred substrate as long as it is available (2, 5), and the consumption of malic acid had a significant effect on carbohydrate utilization. Thus, sugar metabolism seemed to have a different, or more complicated, regulatory system than that known for other LAB, at least in the strains of *L. plantarum* examined in this study.

Biosynthetic metabolism. The expression of proteins involved in purine and pyrimidine metabolism reflected the accessibility of these compounds in the media. The proteins from the de novo synthesis of nucleotides in cucumber juice and MRS broth showed higher expression than in liquid feed (Fig. 5a). It seems that barley, the major ingredient in liquid feed, provided enough nucleotides, so no synthesis was necessary. There was also the indication that the bacteria used riboses (formed in the phosphoketolase pathway) to obtain the pentose ring for the nucleotide synthesis in MRS broth and cucumber juice, as stated above (Fig. 4). However, when there is no need for nucleotide synthesis, as in liquid feed, pentoses follow the heterofermentative pathway, leading to the formation of acetate.

Expression of the enzymes for amino acid metabolism was relatively varied (see Fig. SM5 in the supplemental material). However, expression was generally lower in liquid feed than in the other media. These results reflect the possibility that liquid feed also contains large amounts of amino acids and utilizable peptides. The expression levels of proteins for DNA metabolism were very similar in all three media, as was the expression level of enzymes for protein synthesis.

These results indicate that the *L. plantarum* strains REB1 and MLBPL1 have very similar biosynthetic behavior in all three media, beside the requirements for essential components such as nucleotides and amino acids. This suggests that environmental variability does not affect the biosynthetic pathways.

Stress response. The genes involved in the general stress response are highly conserved among LAB. These genes expressed proteins involved in the maturation of newly synthesized proteins, in the refolding denatured proteins, and in DNA repair (24). However, there are different stress conditions that activate these responses, such as acid and basic stress, oxidative stress, heat and cold stress, osmotic stress, and starvation (3, 9, 15, 24). In our previous study using MRS broth, stress response proteins were prominent in the lag phase, suggesting that the bacteria were adapting to the new fresh batch, whereas in exponential and early stationary phases, the stress response showed a lower and more constant expression level (9). In this study, the identified stress proteins were present but did not show significant differences between the media.

Conclusions. To improve the flavor, texture, or microbiological quality of fermented foods and feeds, it is important to know the metabolism of the responsible microorganisms. This study provides this type of information by addressing the protein expression of two starter strains with different histories under experimental conditions that mimic their actual applications (with fermented vegetables and liquid feed).

The results demonstrated the ability of *L. plantarum* to adapt to different environmental conditions as shown by its capacity to change its metabolic pathways according to the medium used. The carbohydrate fermentation appeared to be very flexible, allowing the bacterium the simultaneous use of different fermentable sugars. This is a very important feature of this species because it makes it very suitable as a potential starter culture for any kind of fermented food and feed products. The performances of the two strains studied here were very similar; REB1, however, showed more proteins that were strongly up-/downregulated than those of MLBPL1. This capacity to switch a specific protein expression is apparently an important characteristic of this bacterium.

The two strains used in this study demonstrate that despite the basic similarity between the overall metabolic profiles of REB1 and MSBPL1, there were also differences, probably reflecting their previous history of use. Further understanding of the specific adaptations will allow selection of starter strains for specific purposes, including strains originating from sources other than food or feed (i.e., intestinal strains).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Technology Agency of Finland (TEKES).

We thank Jim McNicol (Biomathematics and Statistics Scotland, Dundee, Scotland, United Kingdom) for advice on multivariate analysis. T.L.T. thanks Mari Mannila and staff of the Laboratory of Biotechnology at the University of Oulu for help with the chemical analysis.

REFERENCES

1. **Adlerberth, I., S. Ahrne, M. L. Johansson, G. Molin, L. A. Hanson, and A. E. Wold.** 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. Appl. Environ. Microbiol. **62:**2244–2251.
2. **Axelsson, L.** 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology, p. 1–66. *In* S. Salminen, A. von Wright, and A. Ouwehand (ed.), Lactic acid bacteria: microbial and functional aspects, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, NY.
3. **Castaldo, C., R. A. Siciliano, L. Muscariello, R. Marasco, and M. Sacco.** 2006. CcpA affects expression of the groESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum*. Microb. Cell Fact. **5:**35.
4. **Cohen, D. P., J. Renes, F. G. Bouwman, E. G. Zoetendal, E. Mariman, W. M. de Vos, and E. E. Vaughan.** 2006. Proteomic analysis of log to stationary growth phase Lactobacillus plantarum cells and a 2-DE database. Proteomics **6:**6485–6493.
5. **Gänzle, M. G., N. Vermeulen, and R. F. Vogel.** 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. Food Microbiol. **24:**128–138.
6. **Goossens, D., D. Jonkers, E. Stobberingh, and R. Stockbrügger.** 2005. The effect of the probiotic *L-plantarum* 299v on the faecal and mucosal bacterial flora of patients with inactive ulcerative colitis. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. **17:**A62.
7. **Kanehisa, M.** 1997. A database for post-genome analysis. Trends Genet. **13:**375–376.
8. **Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O. P. Kuipers, R. Leer, R. Tarchini, S. A. Peters, H. M. Sandbrink, M. W. E. J. Fiers, W. Stiekema, R. M. K. Lankhorst, P. A. Bron, S. M. Hoffer, M. N. N. Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W. M. de Vos, and R. J. Siezen.** 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100:**1990–1995.
9. **Koistinen, K. M., C. Plumed-Ferrer, S. J. Lehesranta, S. O. Kärenlampi, and A. von Wright.** 2007. Comparison of growth-phase dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Lett. **273:**12–21.
10. **Koistinen, K. M., V. H. Hassinen, P. A. M. Gynther, S. J. Lehesranta, S. I. Keinänen, H. L. Kokko, E. J. Oksanen, A. I. Tervahauta, S. Auriola, and S. O. Kärenlampi.** 2002. Birch PR-10c is induced by factors causing oxidative stress but appears not to confer tolerance to these agents. New Phytol. **155:**381–391.
11. **Lehesranta, S. J., H. V. Davies, L. V. T. Shepherd, N. Nunan, J. W. McNicol, S. Auriola, K. M. Koistinen, S. Suomalainen, H. L. Kokko, and S. O. Kärenlampi.** 2005. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. Plant Physiol. **138:**1690–1699.
12. **McNaught, C. E., N. P. Woodcock, A. D. G. Anderson, and J. MacFie.** 2005. A prospective randomised trial of probiotics in critically ill patients. Clin. Nutr. **24:**211–219.
13. **Passos, F. V., H. P. Fleming, H. M. Hassan, and R. F. McFeeters.** 2003. Effect of malic acid on the growth kinetics of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **63:**207–211.
14. **Pavan, S., P. Hols, J. Delcour, M. C. Geoffroy, C. Grangette, M. Kleerebezem, and A. Mercenier.** 2000. Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. Appl. Environ. Microbiol. **66:**4427–4432.
15. **Pieterse, B., R. J. Leer, F. H. J. Schuren, and M. J. van der Werf.** 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. Microbiology **151:**3881–3894.
16. **Plumed-Ferrer, C., I. Kivelä, P. Hyvönen, and A. von Wright.** 2005. Survival, growth and persistence under farm conditions of a *Lactobacillus plantarum* strain inoculated into liquid pig feed. J. Appl. Microbiol. **99:**851–858.
17. **Plumed-Ferrer, C., M. Llopis, P. Hyvönen, and A. von Wright.** 2004. Characterization of the microbial community and its changes in liquid piglet feed formulations. J. Sci. Food Agric. **84:**1315–1318.
18. **Pouwels, P. H., R. J. Leer, M. Shaw, M. J. H. den Bak-Glashouwer, F. D. Tielen, E. Smit, B. Martinez, J. Jore, and P. L. Conway.** 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. Int. J. Food Microbiol. **41:**155–167.
19. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. **68:**850–858.
20. **Tamminen, M., T. Joutsjoki, M. Sjöblom, M. Joutsen, A. Palva, E. L. Ryhänen, and V. Joutsjoki.** 2004. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. Lett. Appl. Microbiol. **39:**439–444.
21. **Teusink, B., F. H. J. van Enckevort, C. Francke, A. Wiersma, A. Wegkamp, E. J. Smid, and R. J. Siezen.** 2005. In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. Appl. Environ. Microbiol. **71:**7253–7262.
22. **Titgemeyer, F., and W. Hillen.** 2002. Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. Antonie van Leeuwenhoek **82:**59–71.
23. **van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek **82:**187–216.
24. **Yoon, K. Y., E. E. Woodams, and Y. D. Hang.** 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresour. Technol. **97:**1427–1430.

Malaysian Journal of Microbiology, Vol 11(2) Special Issue 2015, pp. 176-184
http://dx.doi.org/10.21161/mjm.13014

Malaysian Journal of Microbiology
Published by Malaysian Society of Microbiology
(In SCOPUS since 2011)

Effects of carbon and nitrogen sources on bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4

May Foong Ooi[1], Nurzafirah Mazlan[1], Hooi Ling Foo[1, 2*], Teck Chwen Loh[3,4], Rosfarizan Mohamad[1,2,5], Raha Abdul Rahim[2,6] and Arbakariya Ariff[1,2]

[1]Department of Bioprocess Technology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.
[2]Institute of Bioscience, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.
[3]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.
[4]Institute of Tropical Agriculture, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.
[5]Institute of Tropical Forestry and Forest Products, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.
[6]Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.
Email: hlfoo@upm.edu.my

ABSTRACT

Aims: Postbiotic metabolites are metabolic compounds produced by probiotic lactic acid bacteria. These compounds produced by *Lactobacillus* sp. have been shown to be effective substitutes for in-feed antibiotic in livestock due to their broad inhibitory activity. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of various carbon and nitrogen sources on the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4.
Methodology and results: The effects of various combinations of carbon and nitrogen sources on the bacteriocin-inhibitory activity (expressed as modified bacteriocin activity, MAU/mL) of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 were determined in basal media without micronutrients. The combination of glucose (20 g/L) and yeast extract (22 g/L) gave the best bacteriocin-inhibitory activity as compared to other combinations. Maximum bacteriocin-inhibitory activity of 1440 MAU/mL was achieved when 36.20 g/L of yeast extract was added as the sole nitrogen source in modified de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium. The glucose concentration was further optimised to enhance the bacteriocin-inhibitory activity of the postbiotic metabolites. Lower bacteriocin-inhibitory activity was observed at 5, 10, 15 and 40 g/L in comparison to 20 g/L of glucose.
Conclusion, significance and impact of study: Maximum bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites was achieved at 1440 MAU/mL when 20 g/L of glucose and 36.20 g/L of yeast extract were added as the sole carbon and nitrogen sources respectively in the modified MRS medium. Optimisation of other micronutrients present in MRS media is necessary to further enhance the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4.

Keywords: Postbiotic metabolites, *Lactobacillus plantarum*, optimisation, modified MRS media, modified bacteriocin activity.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB), frequently termed as "the Lactics" are characterised as gram positive, non sporulating anaerobic but aero-tolerant bacteria with fermentative metabolism (Halasz, 2009). They are fastidious toward nutrient requirement and generally associated with carbohydrate-rich environment such as food, feed, human and animal cavities, as well as sewage and plant materials (Carr *et al.*, 2002). The use of LAB and their metabolites in the food industry is generally regarded as safe (GRAS, grade one) (Zacharoff and Lovitt, 2012). Recently, metabolites produced by probiotic LAB were termed as postbiotic metabolites (Tsilingiri *et al.*, 2012). Postbiotic metabolites commonly produced by LAB include bacteriocins, organic acids, ethanol, diacetyl, acetaldehydes and hydrogen peroxide (Suskovic *et al.*, 2010). Several reports showed that postbiotic metabolites produced by LAB, especially *Lactobacillus* sp. exhibit inhibitory effects towards species which are closely related to the LAB and other unrelated spoilage and pathogenic bacteria (Foo *et al.*, 2003b, Thanh *et al.*, 2010, Bilkova *et al.*, 2011). This broad inhibitory property makes postbiotic metabolites a preferable alternative to antibiotics as feed supplements since abusive use of antibiotics will cause adverse effects on the environment

*Corresponding author

 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

due to antibiotic resistance of bacteria (Forshell and Wierup, 2006, Shazali *et al.*, 2014).

The potential use of postbiotic metabolites as substitution for in-feed antibiotics in livestock has been investigated and proven to be effective (Thu *et al.*, 2011, Choe *et al.*; 2012, Loh *et al.*, 2014). Hence, optimal production of inhibitory activity of postbiotic compounds is important due to its increasing industrial applications. Research in past decades has focused on optimisation of bacteriocin production under controlled fermentation conditions (Kaur *et al.*, 2013; Saraniya and Jeevaratnam, 2014). Bacteriocins are ribosomally-synthesized polypeptides which exhibit bactericidal or bacteriostatic actions towards specific bacteria (Sarika *et al.*, 2010).

Production of bacteriocins is dependent on various factors and is usually strain-specific. One of the factors reported to significantly enhance bacteriocin production is medium composition (Kaur *et al.*, 2013). Investigations on the effects of different carbon and nitrogen sources on production of bacteriocin showed that optimal combination of carbon and nitrogen sources can improve the bacteriocin production (Todorov and Dicks, 2005; Saraniya and Jeevaratnam, 2014). Therefore, the objectives of this study were to identify suitable carbon and nitrogen sources and to determine their concentrations for optimal bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and maintenance

Lactobacillus plantarum I-UL4 used in this study was previously isolated from a local traditional fermented food made from tapioca (Foo *et al.*, 2003a). The isolate was obtained from the Laboratory of Industrial Biotechnology, Department of Bioprocess Technology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia. *Pediococcus acidilactici* ATCC 4-46 was used as an indicator microorganism for the determination of bacteriocin-inhibitory activity. All bacteria were maintained at −20 °C as frozen stock cultures in de Mann Rogosa and Sharpe (MRS) media (Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 20% (v/v) glycerol.

Preparation of inoculums

Bacterial cultures were revived twice by inoculating 1% (v/v) frozen stock cultures into 10 mL MRS broth and incubated at 30 °C under static condition. The cultures were then streaked onto the MRS agar plate and incubated for another 48 h. A single pure colony was then inoculated and incubated in 10 mL MRS broth for 48 h, followed by sub-culturing into 10 mL MRS broth for another 24 h of incubation. Active *L. plantarum* I-UL4 was then incubated for an additional 18 h at 30 °C before being used as an inoculum. The absorbance of the inoculum at 600 nm (OD_{600nm}) was adjusted to 1.0 using sterile 0.85% (w/v) sodium chloride (NaCl) solution prior to inoculating 1.0% (v/v) into the experimental media.

Effects of different combinations of carbon and nitrogen sources

The effects of carbon and nitrogen sources were first evaluated in basal media containing different combinations of carbon and nitrogen sources without incorporating other micronutrients in the MRS broth. The basal media combinations and their concentrations (g/L) were: (a) glucose (20.0) only, (b) molasses (20.0) only, (c) peptone (22.0) only, (d) meat extract (22.0) only, (e) yeast extract (22.0) only, (f) glucose (20.0) and peptone (22.0), (g) glucose (20.0) and meat extract (22.0), (h) glucose (20.0) and yeast extract (22.0), (i) glucose (20.0), peptone (12.2) and meat extract (9.8), (j) glucose (20.0), meat extract (14.7) and yeast extract (7.3), (k) glucose (20.0), peptone (10.0), meat extract (8.0) and yeast extract (4.0), (l) molasses (20.0) and peptone (22.0), (m) molasses (20.0) and meat extract (22.0), (n) molasses (20.0) and yeast extract (22.0), (o) molasses (20.0), peptone (12.2) and meat extract (9.8), (p) molasses (20.0), meat extract (14.7) and yeast extract (7.3) and (q) molasses (20.0), peptone (10.0), meat extract (8.0) and yeast extract (4.0). Glucose, peptone and meat extract were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), whereas yeast extract was purchased from Ohly GmbH (Hamburg, Germany) and molasses was purchased from PT Sdn. Bhd (Selangor, Malaysia). The experimental media were incubated at 30 °C for 36 h under static condition after inoculation with 1.0% (v/v) *L. plantarum* I-UL4. A volume of 1.0 mL culture broth was withdrawn aseptically at 24 h and centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min at 4 °C. Resultant supernatants from each medium containing postbiotic metabolites were then used for the determination of bacteriocin-inhibitory activity. The experiment was performed in triplicate.

Optimisation of selected nitrogen source

Different concentrations (g/L) of the selected nitrogen source were evaluated at 11.89, 27.84, 36.20 and 44.55 individually, while the concentration (g/L) of glucose was fixed at 20.0, sodium acetate at 5.0, diammonium hydrogen citrate at 2.0, dipotassium hydrogen phosphate at 2.0, Tween 80 at 1.0, magnesium sulphate at 0.2 and manganese sulphate at 0.04. Sodium acetate, diammonium hydrogen citrate, dipotassium hydrogen phosphate, Tween 80, magnesium sulphate and manganese sulphate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The inoculated media were incubated at 30 °C for 36 h under static condition with 2 h sampling intervals. The experiment was performed in triplicate. A volume of 10 mL culture broth was withdrawn aseptically and centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min at 4 °C. Collected supernatants were then analysed for bacteriocin-inhibitory activity.

 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

Optimisation of selected carbon source

The effects of glucose, lactose, sucrose and fructose as carbon source were evaluated individually at 20 g/L in the modified MRS media containing the selected nitrogen source at optimum concentration and the other micronutrients in the MRS broth. Lactose, sucrose and fructose were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Different concentrations (g/L) of the best carbon source were then evaluated individually at 0, 5, 10, 15, 20 and 40. The inoculated media were incubated at 30 °C for 36 h under static condition with 2 h sampling intervals. The experiment was performed in triplicate. A volume of 10 mL culture broth was withdrawn aseptically and centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min at 4 °C. Supernatants containing postbiotic metabolites were then used for the determination of bacteriocin-inhibitory activity and glucose concentration.

Determination of bacteriocin-inhibitory activity

Inhibitory activity of postbiotic metabolites was quantified as bacteriocin activity using Agar Well Diffusion Assay (Tagg and McGiven, 1971). Postbiotic metabolites were serially diluted 2 fold (2^0 to 2^{-5}) using sterile 0.85% (w/v) NaCl solution prior to inoculation into respective wells at 20 µL. Diluted postbiotic metabolites were allowed to diffuse around the well for an hour. The plates were then overlaid with 3 mL of soft agar inoculated with 1 % (v/v) *P. acidilactici* 4-46 (OD_{600nm} was adjusted to 1.0) and incubated at 30 °C for 24 h. A clear inhibition zone with a diameter of more than 1 cm indicates positive bacteriocin-inhibitory activity. Bacteriocin-inhibitory activity was expressed as modified bacteriocin activity (MAU/mL) and calculated as shown below (Lim, 2003):

Modified bacteriocin activity (MAU/mL) =

[Highest dilution factor which score positive

activity / Volume inoculated into wells (mL)] x

Diameter of the clear inhibition zone (cm)

Determination of microbial biomass

Five millilitres of the culture broth was filtered through a pre-dried and pre-weighed 0.45 µm cellulose acetate filter paper (Sartorius Stedim Biotech, Germany). After filtration, the filter paper was dried overnight at 105 °C and then cooled in a desiccator at room temperature. The difference between the initial and final filter paper weights is the weight of microbial biomass in the 5 mL broth. Microbial biomass was expressed as gram of dry weight per litre, as described by Li and de Orduna (2009).

Determination of glucose concentration

Glucose concentration in postbiotic metabolites was determined using the Pico Trace Glucose Analyzer (Trace Analytics, Germany) according to the manufacturer's instructions. Ten microliters postbiotic metabolites was used for the analysis.

Statistical analysis

The results were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) using the General Linear Model procedure by Statistical Analysis System (SAS, 1998). Duncan's Multiple Range Test System was used to compare the significant difference between the mean at $p < 0.05$. The results of statistical analysis were presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

RESULTS AND DISCUSSIONS

Effects of different combinations of carbon and nitrogen sources

Based on the results presented in Table 1, no modified bacteriocin activity was detected in the postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 when cultivated in basal media containing only carbon or nitrogen source. The highest modified bacteriocin activity was achieved at 300 MAU/mL when glucose and yeast extract were added at 20 g/L and 22 g/L respectively. However, no bacteriocin-inhibitory activity was detected when glucose was combined with meat extract or peptone in the media. The combination of glucose, yeast extract, peptone and meat extract did not improve the bacteriocin-inhibitory activity of the postbiotic metabolites and yet reduced the modified bacteriocin activity to 240 MAU/mL, which was 20% lower as compared to the combination of glucose and yeast extract. Similar patterns were observed when molasses was used as a carbon source, whereby 200 MAU/mL of modified bacteriocin activity was detected when molasses was combined with yeast extract and the bacteriocin-inhibitory activity was further reduced to 160 MAU/mL when molasses, yeast extract, peptone and meat extract were added into the growth medium.

The results obtained in this study inferred that multiple nitrogen sources would not enhance the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4. Addition of meat extract and peptone in the media gave adverse effects to the modified bacteriocin activity. Similar findings were reported by Todorov and Dicks (2005), whereby reduced bacteriocin activity was obtained for *Lactobacillus plantarum* strains when meat extract was used individually as a nitrogen source in the media or in combination with other nitrogen sources.

Yeast extract was identified as the best nitrogen source for the production of bacteriocin-inhibitory compounds by *L. plantarum* I-UL4. Indeed, the effect of yeast extract as a single organic nitrogen source on the improvement of bacteriocin activity has been reported for

 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

Streptococcus bovis (Carvalho *et al.*, 2008), *Lactobacillus rhomanus* (Sarika *et al.*, 2010) and *Lactobacillus sakei* (Todorov *et al.*, 2012). It is likely that the free amino acids and growth factors present in the yeast extract (Aasen *et al.*, 2000) contributed to the stimulatory effect on the production of bacteriocin-inhibitory compounds by *L. plantarum* I-UL4.

Table 1: Effect of different combinations of carbon and nitrogen sources on the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4.

Media components	Concentration (g/L)	Modified bacteriocin activity (MAU/mL)
Glucose	20	0 ± 0^{g}
Molasses	22	0 ± 0^{g}
Peptone	22	0 ± 0^{g}
Meat extract	20	0 ± 0^{g}
Yeast extract	20	0 ± 0^{g}
Glucose + peptone	20.0+22.0	0 ± 0^{g}
Glucose + meat extract	20.0+22.0	0 ± 0^{g}
Glucose + yeast extract	20.0+22.0	300 ± 0^{a}
Glucose + peptone + meat extract	20.0+12.2+9.8	0 ± 0^{g}
Glucose + meat extract + yeast extract	20.0+14.7+7.3	100 ± 11.54^{e}
Glucose + peptone + meat extract + yeast extract	20.0+10.0+8.0+4.0	240 ± 11.54^{b}
Molasses + peptone	20.0+22.0	0 ± 0^{g}
Molasses + meat extract	20.0+22.0	0 ± 0^{g}
Molasses + yeast extract	20.0+22.0	200 ± 23.09^{c}
Molasses + peptone + meat extract	20.0+12.2+9.8	0 ± 0^{g}
Molasses + meat extract + yeast extract	20.0+14.7+7.3	80 ± 0^{f}
Molasses + peptone + meat extract + yeast extract	20.0+10.0+8.0+4.0	160 ± 0^{d}

Notes: Values are mean ± standard error of the mean (SEM), n =3. Means in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$)

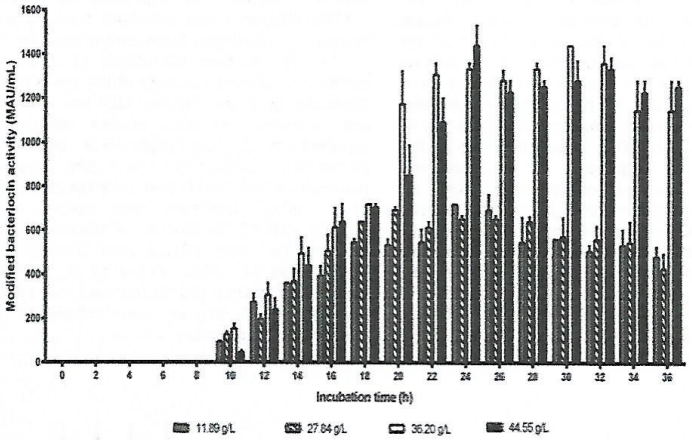
Optimisation of yeast extract concentration

Optimisation of the yeast extract concentration was performed in the modified MRS broth to further enhance the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites. Total nitrogen content of the yeast extract was previously determined using Kjeltec™ 2400 (FOSS, UK) (data not shown) and the concentrations of the yeast extract used in the present study corresponds to 80 mM for 11.89 g/L (which is the same level contained in MRS broth), 200 mM for 27.84 g/L, 260 mM for 36.20 g/L and 320 mM for 44.55 g/L. Generally, bacteriocin-inhibitory activity was detected at the 10 h regardless of the concentration of yeast extracts used (Figure 1). Highest bacteriocin-inhibitory activity (1440 MAU/mL) was achieved in the media containing 36.20 g/L of yeast extract at the 30 h and 44.55 g/L of yeast extract at the 24 h of incubation. The bacteriocin-inhibitory activity achieved at 11.89 g/L and 27.84 g/L of yeast extract was in the range of 100-720 MAU/mL, which was much lower as compared to the bacteriocin-inhibitory activity achieved at 36.20 g/L and 44.55 g/L. The results obtained in this study indicated that increasing concentrations of yeast extract in the modified MRS media enhanced bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 significantly at $p < 0.05$. Similar finding was reported by Aasen *et al.* (2000), whereby production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* was increased linearly with the concentration of yeast extract. Likewise, higher amount of bacteriocin-like activity (640 AU/mL) was produced by *Enterococcus durans* when 2.0% (w/v) of yeast extract was added in the media as compared to the bacteriocin-like activity (320 AU/mL) achieved in the media containing 1.0% (w/v) of yeast extract (Khay *et al.*, 2013).

Moreover, Figure 2 shows that the growth of *L. plantarum* I-UL4 was favoured at higher concentrations of yeast extract. Shorter exponential phase (from 6 h to 12 h) was observed at 11.89 g/L and 27.84 g/L as compared to 36.20 g/L of yeast extract, whereby exponential growth phase was noted at 8 h to 18 h of incubation. Although higher nitrogen content was found in 44.55 g/L of yeast extract, biomass throughout the incubation period (except at 24 h where the maximum MAU/mL was noted) was relatively low in comparison to that in media containing 36.20 g/L yeast extract. Therefore, the highest concentration of yeast extract used may not necessarily produce maximum biomass.

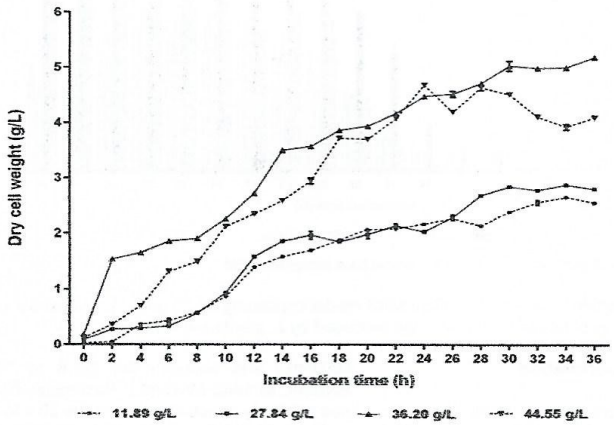
This further inferred that an optimal carbon to nitrogen ratio (C/N) is essential in promoting optimal growth for *L. plantarum* I-UL4. DeGeest and De Vuyst (1999) also reported that the growth of *Streptococcus thermophilus* LY03 was influenced by C/N ratio of the growth media. By evaluating the results obtained for the growth and bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites, 36.20 g/L of yeast extract was identified as the optimal concentration of nitrogen source for the production of bacteriocin-inhibitory compounds by *L. plantarum* I-UL4.

 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538



Values are mean ± standard error of the mean (SEM), n=3. Vertical bars represent SEM.

Figure 1: Effect of different yeast extract concentrations in modified MRS media on the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4.



Values are mean ± standard error of the mean (SEM), n=3. Vertical bars represent SEM.

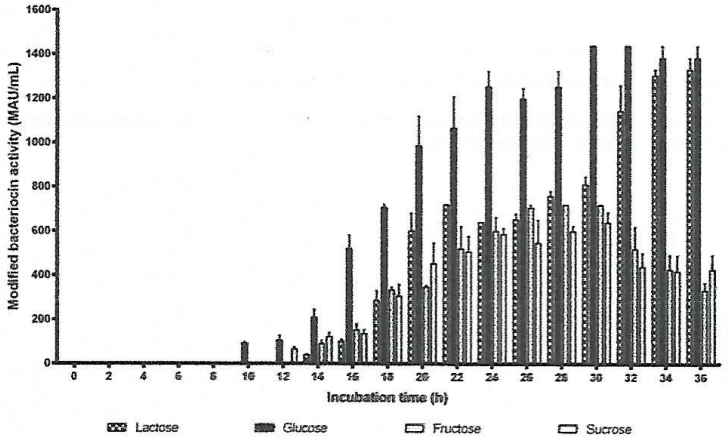
Figure 2: Effect of different yeast extract concentrations in modified MRS media on the growth of *L. plantarum* I-UL4.

Determination of optimum carbon source

The effects of four carbon sources: lactose, glucose, sucrose and fructose on the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites were determined at 20 g/L in the modified MRS broth. Different initial production time of bacteriocin-inhibitory activity was detected for postbiotic metabolites produced by L. plantarum I-UL4 using media containing different carbon sources. The bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites was began to be detected at 10 h for the medium containing glucose, 12 h for medium containing sucrose and 14 h for media containing lactose and fructose respectively. Exponential production of bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic

metabolites at 20 g/L of glucose was observed from the 12 h to 20 h and the activity was then maintained in the range of 1200-1440 MAU/mL from 22 h onwards (Figure 3). However, approximately 41.0% of increment of the modified bacteriocin activity was observed at the 32 h as compared to the 30 h when lactose was utilised as a carbon source. Before the 30 h, bacteriocin-inhibitory activity of the postbiotic metabolites was relatively low in lactose-containing medium. This is possibly due to the microorganism requiring longer time for the enzymatic degradation of the lactose disaccharide form as compared to glucose. The modified bacteriocin activity achieved in the media containing sucrose (640 MAU/mL) and fructose (720 MAU/mL) was two-fold lower as compared to that obtained in glucose and lactose medium, implying *L. plantarum* I-UL4 is capable of metabolising different carbon sources to produce different levels of bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites. Glucose was identified as the best carbon source attributed to the high modified bacteriocin activity (>1200 MAU/mL) was achieved from 22 h to 36 h as compared to the other three carbon sources.

The results from the effects of carbon sources on bacteriocin-inhibitory activity of the postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 are also in agreement with findings from other studies, where glucose was reported to be the preferential carbon source for bacteriocin production by *Streptococcus bovicin* (Carvalho *et al.*, 2008) and *Lactobacillus sakei* (Todorov *et al.*, 2012). However, other carbon sources which support optimal bacteriocin production have also been reported for other LAB strains (Cheigh *et al.*, 2002; Drosinos *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2010). Moreover, Hayek and Ibrahim (2013) reported that LAB growth and their metabolic activity were influenced by different concentrations of carbon source.



Values are mean ± standard error of the mean (SEM), n=3. Vertical bars represent SEM

Figure 3: Effect of different carbon sources in modified MRS media containing 36.20 g/L of yeast extract on the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4.

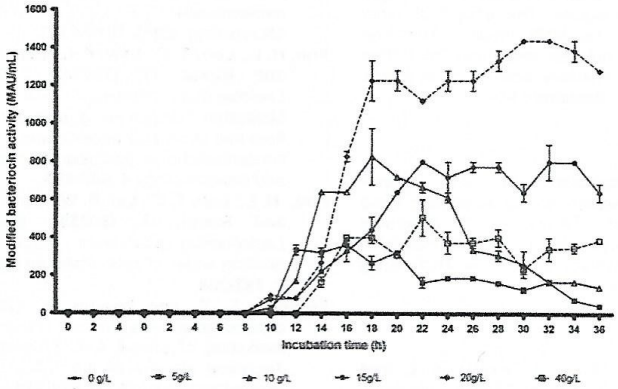
Optimisation of glucose concentration

Generally, bacteriocin-inhibitory activity of the postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 was detected at the 10 h in the 10 g/L, 15 g/L and 20 g/L glucose-containing media and at the 12 h for 5 g/L glucose-containing medium and 14 h for 40 g/L glucose-containing medium respectively (Figure 4). Maximum bacteriocin-inhibitory activity was achieved at 1440 MAU/mL in the medium containing 20 g/L glucose. At this concentration, intermittent production of bacteriocin-inhibitory activity was observed where substantial increment of the bacteriocin-inhibitory activity was noted between the 12 h to 18 h of incubation (from 80 MAU/mL to 1226.67 MAU/mL) and between the 26 h to 32 h (1226.67 MAU/mL to 1440 MAU/mL). Bacteriocin-inhibitory activity was relatively constant between the 20 h to 24 h. A similar profile was observed when *L. plantarum* I-UL4 was cultivated in 10 g/L of glucose although the bacteriocin-inhibitory activity was lower (826.67 MAU/mL). However, the onset time of the bacteriocin-inhibitory activity increment was observed between the 10 h to 14 h and between the 16 h to 18 h of incubations.

As for the 40 g/L of glucose, highest bacteriocin-inhibitory activity was at 506.67 MAU/mL, which was unexpectedly lower as compared to 10 g/L (826.67 MAU/mL) and 15 g/L (800 MAU/mL). The high concentration of glucose (> 20 g/L) in the media did not

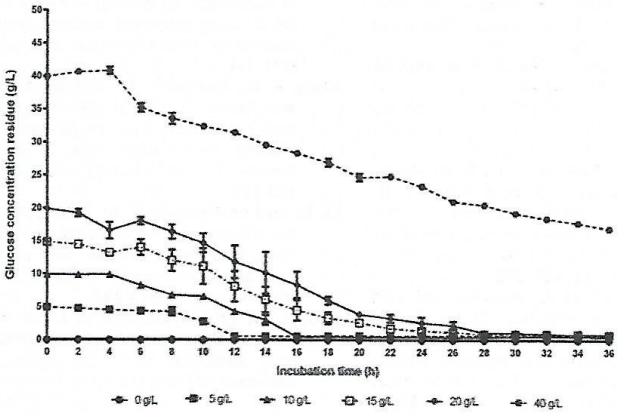
 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

enhance the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 within the 36 h of incubation. Similar observations were reported for the bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 (Khay *et al.*, 2013) and antimicrobial compound production by *Lactobacillus pentosus* SJ65 (Saraniya and Jeevaratnam, 2014). The reduction of the inhibitory activity was reported to be attributed to the substrate inhibition when high glucose concentration was employed in the media (Khay *et al.*, 2013) as shown in the present study. Figure 5 shows that approximately 42% from the 40 g/L of glucose remained in the media at the 36 h of incubation. For the other tested glucose concentrations, the glucose residues remained in the postbiotic metabolites were generally lower than 1 g/L.



Values are mean ± standard error of the mean (SEM), n=3. Vertical bars represent SEM.

Figure 4: Effect of different glucose concentrations in modified MRS media on the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4.



Values are mean ± standard error of the mean (SEM), n=3. Vertical bars represent SEM.

Figure 5: The glucose concentration of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 using different glucose concentrations in modified MRS media.

 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

CONCLUSIONS

The optimum carbon and nitrogen sources for the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4 were glucose at 20 g/L and yeast extract at 36.20 g/L, whereby the maximum modified bacteriocin activity of the postbiotic metabolites was achieved at 1440 MAU/mL, which was two-fold higher as compared to activity detected in media consisting of the same amount of carbon and nitrogen content found in MRS medium. The effects of other micronutrients present in the MRS medium and their optimal concentrations should be determined to further enhance the bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *L. plantarum* I-UL4.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by the Special Commercialisation of Research and Development Fund (CRDF) from Malaysian Technology Development Corporation (MTDC), Malaysia and Long Term Research Grant Scheme from the Ministry of Science, Technology and Innovation of Malaysia.

REFERENCES

Aasen, I. M., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, L. and Storro, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53, 159-166.**

Bilkova, A., Kinova Sepova, H., Bukovsky, M. and Bezakova, L. (2011). Antibacterial potential of *Lactobacilli* isolated from a lamb. *Veterinarni Medicina* **56 (7), 319-324.**

Carr, F. J., Chill, D. and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* **28(4), 281-370.**

Carvalho, H. C., Mantovani, H. C., Paiva, A. D. and De Melo, M.R. (2008). The effect of carbon and nitrogen sources on bovicin HC5 production by *Streptococcus bovis* HC5. *Journal of Applied Microbiology* **107, 339-347.**

Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., Hwang, J. K. and Pyun, Y. R. (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology* **95, 225-235.**

Choe, D. W., Loh, T. C., Foo, H. L., Hair-Bejo, M. and Awis, Q. S. (2012). Egg production, faecal pH and microbial population, small intestinal morphology, and plasma and yolk cholesterol in laying hens given liquid metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains. *British Poultry Science* **53(1), 106-115.**

Degeest, B. and De Vuyst, L. (1999). Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology* **65(7), 2863-2870.**

Drosinos, E. H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M. and Metaxopoulos, J. (2005). Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology* **99(6), 1314-1323.**

Foo, H. L., Loh, T. C., Law, F. L., Lim, Y. Z., Kufli, C. N. and Rusul, G. (2003a). Effects of feeding *Lactobacillus plantarum* I-UL4 isolated from Malaysian Tempeh on growth performance, faecal flora and lactic acid bacteria and plasma cholesterol concentrations in postweaning rats. *Food Science and Biotechnology* **4, 403-408.**

Foo, H. L., Loh, T. C., Lai, P. W., Lim, Y. Z., Kufli, C. N. and Rusul, G. (2003b). Effects of adding *Lactobacillus plantarum* I-UL4 metabolites in drinking water of rats. *Pakistan Journal of Nutrition* **2, 283-288.**

Forshell, L. P. and Wierup, M. (2006). Salmonella contamination: A significant challenge to the global marketing of animal food products. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)* **25 (2), 541-554.**

Halasz, A. (2009). Lactic Acid Bacteria. *In:* Food Quality and Standards (Vol. 3). EOLSS Publishers Co Ltd, United Kingdom. **pp. 70-83.**

Hayek, S. A. and Ibrahim, S. A. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A review. *Food and Nutrition Sciences* **4, 73-87.**

Kaur, B., Garg, N. and Sachdev, A. (2013). Optimisation of bacteriocin production in *Pediococcus acidilactici* BA28 using response surface methodology. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **6(1), 1-4.**

Khay, E. Q., Ouhsassi, M., Harsal, A. E., Idaomar, M., and Abrini, J. (2013). Optimisation of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* **1(4), 155-159.**

Li, E. and de Orduna, R. M. (2009). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology* **50, 283-288.**

Lim, Y. S. (2003). Isolation of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and purification of selected bacteriocin from traditional fermented foods. M.Sc. Thesis. University of Putra Malaysia, Malaysia.

 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

Loh, T. C., Choe, D. W., Foo, H. L., Awis, Q. S. and Hair-Bejo, M. (2014). Effects of feeding different postbiotic metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* strains on egg quality and production performance, faecal parameters and plasma cholesterol in laying hens. *BMC Veterinary Research* **10(149), 1-9.**

Saraniya, A. and Jeevaratnam, K. (2014). Optimisation of nutritional and non-nutritional factors involved for production of antimicrobial compounds from *Lactobacillus pentosus* SJ65 using response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiology* **45(1), 81-88.**

Sarika, A., Lipton, A. P. and Aishwarya, M. S. (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology* **2(5), 291-297.**

SAS, Institute Inc. (1998). SAS/ETS® 9.1 user's guide. SAS Institute Inc. Cary, North California, United States of America.

Shazali, N., Foo, H. L., Loh, T. C., Choe, D. W. and Rahim, R. A. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. *Gut Pathogens* **6(1), 1-7.**

Suskovic, J., Kos, B., Beganovic, G., Pavunc, A. L., Habjanic, K. and Matosic, S. (2010). Antimicrobial activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology* **48(3), 296-307.**

Tagg, J. R., and McGiven, A. R. (1971). Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* **21(5), 943.**

Thanh, N. T., Loh, T. C., Foo, H. L., Bejo, M. H. and Azhar B. K. (2010). Inhibitory activity of metabolites produced by strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Malaysian fermented foods. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* **5(1), 37-44.**

Thu, T. V., Loh T. C., Foo, H. L., Yaakub, H. and Bejo, M. H. (2011). Effects of liquid metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faeces characteristics, intestinal morphology and diarrhoea incidence in postweaning piglets. *Tropical Animal Health and Production* **43, 69-75.**

Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2005). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiological Research* **161, 102-108.**

Todorov, S. D. and Oliveira, R. P. S. (2012). Media optimisation of bacteriocin ST22Ch production by *Lactobacillus Sakei* ST22Ch isolated from Salpicao, a traditional meat product from Portugal. *Chemical Engineering Transactions* **27, 283-288.**

Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., and Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* **61, 1007-1015.**

Wang, Q., Cui, Y., Lackeyram, D., Yuan, L., Xu, J., Wang, W. (2010). Effect of cultural components on antimicrobial activity of bacteriocin produced by bacterial isolated from poultry. *African Journal of Microbiolgy Research* **4(19), 1970-1980.**

Zacharof, M. P. and Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Asia-Pacific Chemical, Biological and Environmental Engineering Society Procedia* **2, 50-56.**

 ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

Додаток 5

Перелік публікацій

за період навчання у бакалавраті

Статті у журналах:

1. *Попова І.В., Мазур Л.М., Сімурова Н.В., Черепанський В.В.* Освітній процес формування культури екобезпечного розвитку суспільства // Екологічні науки. – 2018. – Т.20, №1. – С. 118-121.

2. *Черепанський В.В., Грегірчак Н.М.* Збереження життєздатності клітин як запорука якості пробіотичних препаратів // Наукові праці НУХТ. – 2019. – Т. 25, №6. – С. 7-14.

3. *Черепанський В.В., Грегірчак Н.М.* Особливості технологічного процесу виробництва сухого пробіотичного препарату на основі лактобацил // Наукові праці НУХТ. – 2020. – Т.26, №3. – (***прийнято до публікації***).

Статті у збірниках міжнародних конференцій:

1. *Черепанский В., Покойовец К., Грегирчак Н.* Исследование микробиологической безопасности хлеба // Сборник статей IV Международной научно-практической конференции «Переработка и управление качеством сельскохозяйственной продукции» (г. Минск, Республика Беларусь, 21-22 марта 2019 года) – С. 233-236.

2. *Черепанський В.В., Грегірчак Н.М.* Використання вітчизняних штамів лактобацил в розробці українських пробіотичних препаратів // Збірник наукових праць IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (м. Харків, 7-8 листопада 2019 р.). – С. 489-492.

Тези у збірниках міжнародних та всеукраїнських конференцій:

1. *Черепанський В., Сімурова Н., Сімуров О.* Розробка сухої швидкорозчинної форми дієтичної добавки для запобігання дефіциту кальцію та ряду інших макро- та мікроелементів // Матеріали 84 міжнародної

наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 23-24 квітня 2018 р.) ч. 2. – С. 443.

2. *Черепанский В., Покойовец К., Грегирчак Н.* Оценка санитарного состояния хлебопекарного производства // Технология органических веществ: материалы докладов 83 научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием) (г. Минск, Республика Беларусь, 4-15 февраля 2019 г.) – С. 195-196.

3. *Черепанський В.* Синтез нових похідних нафталевої кислоти // Матеріали 85 ювілейної міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті», присвяченої 135-річчю Національного університету харчових технологій (м. Київ, НУХТ, 11-12 квітня 2019 р.) ч. 2. – С. 206.

4. *Черепанський В.В. Грегірчак Н.М.* Дослідження виживання пробіотичних штамів мікроорганізмів у біоплівці для харчових продуктів // Матеріали VII міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (м. Київ, 15 листопада 2019 р.) – С. 181-182.

5. *Черепанський В., Сімурова Н.* Синтез нових похідних 2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діону // Матеріали 86 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.) ч. 2. – С. 223.

6. *Черепанський В., Грегірчак Н.* Використання пакетиків-саше як первинної упаковки для пробіотичних препаратів // Матеріали 86 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, НУХТ, 2-3 квітня 2020 р.) ч. 1. – С. 410.

7. *Черепанский В.В., Грегирчак Н.Н.* Разработка конкурентоспособного пробиотического препарата для рынка Украины // 71-я научно-техническая конференция учащихся, студентов и магистрантов БГТУ (г. Минск, Республика Беларусь, 20-25 апреля 2020 г.) – (***прийнято до публікації***).

8. *Черепанский В.В., Грегирчак Н.Н.* Особенности этапов производства пробиотического препарата с использованием лактобацилл // Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и инновации – 2020» (г. Горки, Республика Беларусь, 14-16 мая 2020 г.) - (***прийнято до публікації***).

9. *Черепанский В.В., Грегирчак Н.Н*. Особенности разработки отечественных пробиотических препаратов // I Республиканская научно-практическая конференция фармакологов с международным участием «Актуальные вопросы фармакологии: от разработки лекарств до их рационального применения» (г. Бухара, Республика Узбекистан, 28-29 мая 2020 г.) - (***прийнято до публікації***).

10. *Черепанський В.В., Грегірчак Н.М.* Аналіз збереження життєздатності клітин пробіотичних штамів мікроорганізмів у біодеградабельній плівці // XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (для студентів, аспірантів і молодих учених) (м. Київ, 24 квітня 2020 р., Збірник буде оприлюднено до 20.05.2020 р.) – С. 91.

УДК 502.3

ОСВІТНІЙ ПРОЦЕС ФОРМУВАННЯ КУЛЬТУРИ ЕКОБЕЗПЕЧНОГО РОЗВИТКУ СУСПІЛЬСТВА

Попова І.В., Мазур Л.М., Сімурова Н.В., Черепанський В.В.
Національний університет харчових технологій
вул. Володимирська, 68, 01601, м. Київ
ivpopova@bigmir.net
mazurlarisa1970@gmail.com
simurova@rambler.ru
cherepanscky @ukr.net

Досвід останніх десятиріч засвідчив, що подолання і навіть пом'якшення екологічної кризи, що настає, суто технічними засобами неможливе. Для того, щоб змінити тенденцію погіршення глобальних та регіональних екологічних зрушень, людям необхідно перебудувати свій спосіб життя. Іншою має стати цивілізація, іншим – духовний світ людини. Це можливе лише при певному рівні екологічної освіти та культури. Саме тому проблема формування екологічно відповідальної особистості нині є такою актуальною і тому серед перспектив розвитку екологічної культури в Україні центральне місце відводиться екологічній освіті. *Ключові слова:* екологічна освіта, екобезпека, екологічна свідомість, сталий розвиток.

Образовательный процесс формирования культуры экобезопасного развития общества. Попова И.В., Мазур Л.М., Симурова Н.В., Черепанский В.В. Опыт последних десятилетий показал, что преодоление и даже смягчение наступающего экологического кризиса чисто техническими средствами невозможно. Для того, чтобы изменить тенденцию ухудшения глобальных и региональных экологических сдвигов, людям необходимо перестроить свой образ жизни. Другой должна стать цивилизация, другим – духовный мир человека. Это возможно только при определенном уровне экологического образования и культуры. Именно поэтому проблема формирования экологически ответственной личности сейчас столь актуальна и поэтому среди перспектив развития экологической культуры в Украине центральное место отводится экологическому образованию. *Ключевые слова:* экологическое образование, экобезопасность, экологическое сознание, устойчивое развитие.

Educational process for forming the culture of eco-profitable development. Popova I., Mazur L., Simurova N., Cherepanskii V. The experience of the last decades has shown that overcoming and, even, mitigating the emerging ecological crisis is not possible by technical means. People need to rebuild their way of life in order to change the tendency of deteriorating global and regional ecological shifts. Another must be civilization, the other – the spiritual world of man. This is possible only at a certain level of environmental education and culture. That is why the problem of formation of an ecologically responsible personality is now so relevant and therefore the ecological education is central to the prospects for the development of ecological culture in Ukraine. *Key words:* ecological education, ecosafety, ecological consciousness, sustainable development.

Постановка проблеми. Відносини у сфері формування екологічної свідомості і, як наслідок, екологічної культури громадянина України під впливом соціальних, політичних, економічних, медичних та психологічних факторів є об'єктом нашого дослідження. До предмета дослідження доречно буде віднести такі явища, як «екологічна культура», «екологічна свідомість», «екологічна освіта» тощо. Питання місця екології серед інших наук, ознаки та підґрунтя формування екологічної культури осмислювали та обговорювали багато дослідників.

У сучасній літературі поширене розуміння екологічної культури особистості як складного інтегративного утворення, якості особистості, що характеризується сформованим ціннісно-мотиваційним ставленням до навколишньої дійсності та людства, високим рівнем оволодіння системою екологічних знань, способами творчої екологічної діяльності. У різних авторів (Хилько, Курняк, Фенчак, Єфіменко, Чернікова та ін.) зустрічаємо тотожні погляди на структуру екологічної культури особистості: інтелектуальна, ціннісно-мотиваційна (у Фенчак – потребо-мотиваційна) і діяльнісна компоненти [1].

Виклад основного матеріалу. Отже, культура (насамперед екологічна) – це простір буття людини, і саме тому можливість збереження природи, побудови гармонійного співіснування людини і природи залежить не від біологічних аспектів, а від життєтворчості особистості, усвідомленої культури способу буття. Хоча можемо вважати фундаментом майбутнього опанування культури природні задатки, талант, особливості темпераменту та індивідуального стилю розумової діяльності. Але формування культури відбувається в процесі соціалізації, інкультурації, самовдосконалення. Отже, спеціальні види діяльності – екологічна освіта, просвіта, екологічне виховання – шлях формування екологічної культури особистості.

Аналізуючи визначення екологічної культури особистості і результати нашого дослідження, можна зробити висновок: необхідні складові частини екологічної культури особистості високого рівня – сформована екологічна свідомість, мотивація екологічної поведінки особистості, розвинене екологічне мислення, екоетичні цінності особистості, естетичне сприйняття середовища, такі властивості особистості, як відповідальність, креативність, емпатія, високі моральні засади, сформована культура збереження здоров'я і здоровий спосіб життя і, як наслідок, свідома екологічна діяльність особистості як у професійній галузі, так і в повсякденному житті індивіда [2].

Провідна компонента сформованої екологічної культури особистості – свідома екологічна діяльність. Актуальні види свідомої екологічної діяльності:

– мисленнєва діяльність у науковій, освітній, культурологічній галузі з дослідження питань формування і розвитку екологічної культури, мотивація екологічної поведінки особистості;

– впровадження здорового способу життя, опанування культури здоров'язбереження;

– творча художня діяльність, що народжує витвори мистецтва, що відображають красу нашої землі, любов до всього живого і є компонентою свідомої екологічної діяльності [3; 4].

Екологічна свідомість є історичною категорією. Вона виникає в той період, коли ставлення суспільства до природи призводить до порушення екологічної рівноваги в природі. Тому інтенсивність екологічної кризи впливає на екологічну свідомість. Екологічна свідомість – це не тільки усвідомлення обмеженості природи, її потужності, влади людини над нею, але й результат усвідомлення того, що джерела енергії за сучасних умов життя людини можуть змінитися на тривалий час або зникнути назавжди.

Екологічна свідомість припускає, що окрема людина і суспільні групи поважають існування потреб інших людей або суспільних груп. Існують розбіжності в понятійному визначенні екологічної свідомості, яка є результатом різних теоретичних підходів до його визначення, існування різних систем суспільних цінностей і різних суспільно-економічних відносин. Понад усе коротко екологічну свідомість можна визначити як свідомість, яка охоплює наші уявлення, способи звернення, сферу діяльності, бажання очікування, яке стосуються навколишнього природного середовища [5].

Щодо сутності поняття екологічної свідомості, доходимо до висновку, що ця свідомість являє собою психологічну єдність ряду взаємопов'язаних структур:

1. психічне відтворення природного і штучно створеного людиною зовнішнього середовища;

2. психічне відтворення власного «я» у цьому світі, тобто чітке виділення суб'єкта і об'єкта життєдіяльності («я» і «не-я» сутності);

3. саморефлексія та саморегуляція, завдяки яким утворюється відчуття причетності, формується ставлення «я» до дійсності.

Особливий акцент у такому розумінні екосвідомості можна приділити категорії відношення. Як категорія свідомості ставлення «я» до дійсності детерміноване:

а) психічними станами суб'єкта, котрі зумовлені єдністю всіх психічних процесів (емоцій, волі, уяви, мислення, пам'яті тощо);

б) реальним станом об'єктивної дійсності (екології). Цим самим, свідомість екологічно інтенційована, тобто спрямована в екологічну площину. Сюди ж належать і конкретні знання щодо екології, емпіричні та наукові уявлення, оцінки, норми, моделі, прогнози тощо;

в) соціальним, культурним, моральним усім життєвим досвідом (звичайно, у складі індивідуальної чи (і) суспільної свідомості);

г) співвідношенням і змістом виразливо рефлексованих (усвідомлюваних) і невиразно відчуттєвих (підсвідомих) суб'єктивно значущих цінностей;

ґ) характером мовно-мисленнєвих, логікосемантичних операцій переробки і психологічної інтерпретації усіх щойно позначених детермінант. Від цієї складової частини залежить глибина, рівні узагальнення, ступінь інтегрованості, адаптивна доцільність екологічної свідомості, що індикативно проявляється тією чи іншою об'єктивованістю суб'єктивної картини світу. Дані позиції визначають складові частини екологічного «я – відношення», тим самим спрямовують свідомість у нову її якість – екологічну. Під впливом Чорнобильської катастрофи відбулися трансформації в усіх складових елементах системи «еко-я-відношень»: від станів – через оцінки, екологічний досвід і цінності – до інтегрального мислення (модель адаптогенезу екологічної свідомості В.О. Скребця) [5; 6].

Екологічна освіта має йти у зворотному напрямі від вивчення суб'єктивних психоемоційних станів людей через формування екологічного мислення, формування екологічних цінностей, набуття індивідуального та суспільного екологічного досвіду, наповнення позитивним змістом екологічних дій та вчинків до відчуття стану причетності, гармонійності з оточуючим світом та власним «Я» [7].

Процес формування екологічної свідомості складається з трьох стадій:

1. стадія побутової екологічної свідомості, що характеризується поведінкою, яка спирається на неперевірену інформацію та думки;

2. стадія ідеологічної свідомості, яка формується під впливом наукових знань, але становить лише поверхові знання;

3. стадія універсальної, наукової свідомості, сформованої внаслідок набутих знань та виховання в дусі єдності з природою.

Щоденна поведінка людини має здійснюватись відповідно до переконань, що випливають з еколо-

гічної свідомості, має піддаватися критичній оцінці, і шляхом до цього є екологічне виховання – формування екологічної свідомості, виховання внутрішньої етики та самокритики, спонукання до природоохоронної діяльності [8].

На сучасну початкову, середню та вищу школу – усю систему виховання та освіти покладається нове завдання принципової та фундаментальної важливості: не тільки відображати вже створені норми та стереотипи суспільного розвитку, але й очолити інноваційний процес формування нової парадигми сучасної культури, здійснити становлення системи освіти задля сталого розвитку (ОСР).

Розвиток екологічної освіти та поширення екологічної інформації – один зі стратегічних принципів державної політики України. Формування цілісного екологічного світогляду, високого рівня культури та екологічних знань на підгрунті гармонійних взаємин людського суспільства і природи поступово стає потужним важелем у вирішенні екологічних і соціально-економічних проблем сучасної України та Європи [8].

Розуміння того, що антропоцентричне екологічне виховання веде в нікуди, є першим кроком до вирішення психологічної та духовно-екологічної кризи – це основа нової екологічної парадигми, яка характеризується такими ознаками:

1. людина, незважаючи на винятковість, є однією з багатьох істот, що живуть на Землі, у цілісній глобальній системі;

2. діяльність людини зумовлена не лише соціальними та культурними чинниками, а й біофізичними, екологічними обмеженнями (адже людина живе у природному середовищі);

3. хоч людина як істота мисляча вміє розв'язувати проблеми, проте це не означає, що вона може порушувати природні закони.

Зміна ціннісного стереотипу суспільства та суспільної свідомості передбачає трансформацію поглядів та уявлень людини, коли засвоєні знання й екологічні норми стають її власними переконаннями, внутрішніми регуляторами поведінки. Головним показником сформованості екологічної свідомості є готовність особистості до конкретних конструктивних дій щодо охорони й розвитку природного середовища [7; 8].

Проблема формування екологічної свідомості молоді є однією з пріоритетних на сучасному етапі розвитку вітчизняної екологічної психології. Це зумовлено рядом причин. По-перше, аналіз екопсихологічної літератури з питань освіти та виховання молоді показує, що, зазвичай, екологічно зумовлений навчально-виховний процес пов'язують з екологічною або просто біологічною просвітою (уроки екології, біології, основ здоров'я, виховні заходи). У цьому контексті екологічна вихованість розглядається як певний обов'язковий результат екологічної освіти. Вважається, що екологічна вихованість людини «автоматично» з'являється як результат достатньої екологічної ерудованості. По-друге, фактично не існує логічно узгоджених технологій виховного впливу, які використовуються в практичній діяльності.

Досить суттєвим та перспективним у цьому контексті, з нашого погляду, є компліцит-концептуальний підхід до створення цільових програм екологічної освіти на виховання [8]. Компліцитність (причетність) однією з найважливіших характеристик екологічної свідомості, через яку свідомість і стає екологічно детермінованою. Тому саме з нею (компліцитністю) потрібно працювати, формуючи екологічну свідомість дітей, розвивати та прививати таку якість у навчальному процесі. Цей підхід передбачає внесення до змісту екологічного виховання таких компонентів: культура мислення, досвід, ціннісні орієнтації, суб'єктивне оцінювання і психічні стани.

На сучасному етапі вчена громадськість світу займається пошуком ефективних шляхів формування нової екологічної свідомості у підростаючих поколінь, про що свідчить зародження та розвиток таких дисциплін, як созологія, біоетика, екологічна педагогіка, созопсихологія, созотехніка, екофілософія, соціальна екологія, екологія культури і навіть екологія душі.

Головні висновки. Мета екологічної освіти полягає в тому, щоб пробудити в усіх вікових групах населення занепокоєність станом природного середовища та поєднати екологічне мислення й екологічну поведінку з розумінням того, що все у світі взаємопов'язане, що певна дія людини викликає часом непередбачені наслідки впливу на природу. Отже, проблема формування екологічної культури особистості виявляється комплексною, тому вимагає і комплексного підходу, аналізу продуктивності цього процесу, чинників його ефективності і умов його впровадження в соціокультурну та державно-правову практику. Комплексний підхід до процесу формування екологічної культури особистості вимагає взаємопов'язаного розвитку всіх складових елементів цього феномену в їх взаємозалежності, взаємозв'язку, взаємному впливі один на одного і на кінцевий результат – рівень сформованості екологічної культури особистості, який виявляється як у ставленні людини до природи, осмисленні законів її розвитку, так і в діяльності індивіда.

Література

1. Складановська М.Г. Екологічна культура особистості та мотивація її екологічної діяльності. Збірник наукових праць: наукові записки Рівненського державного гуманітарного університету. 2011. Вип. 17. Т. 2. URL: http://archive.nbuv.gov.ua/portal/soc_gum/Uk_msshr/2011_17_2/skladan.pdf.

2. Pedologiczne aspekty ekologii i ohrony srodowiska. Olsztyn: Wydawnictwo Uniwersytetu Warminsko-Mazurskiego, 2002. 157 s.
3. Валєшний В.В. Екологічна культура особистості. Здоровий спосіб життя: проблеми та досвід: Міжнар. наук.-практ. конф., 19–20 квіт. 2007 р.:Тези доп. Д., 2007. 35 с.
4. Володін П.В. Проблема формування екологічної свідомості особи. Гуманітарний вісник ЗДІА. 2010. Вип. 37. С. 43–53.
5. Дідков О.М. Формування екологічної свідомості та культури засобами освіти та виховання особистості. Збірник наукових праць Гілея: науковий вісник. 2012. Вип. 63 URL: http://archive.nbuv.gov.ua/portal/Soc_Gum/Gileya/2012_63/Gileya63/F44_doc.pdf.
6. Льовочкіна А.М. Віковий підхід до формування екологічної свідомості, екологічної культури та екологічного способу життя. Актуальні проблеми психології. Збірник наукових праць Інституту психології ім. Г.С. Костюка АПН України / за ред. Максименка С.Д. К.: 2009, т. 7. Вип. 20. С. 269–272.
7. Онопрієнко В.П. Позанавчальні методи і засоби виховання екологічної свідомості. Гілея. Історичні науки. Філософські науки. Політичні науки: наук. вісник: зб. наук. праць. Вип. 63 (№ 8) / Нац. пед. ун-т ім. М.П. Драгоманова, Українська АН; голов. ред. В.М. Вашкевич. К.: Вид-во НПУ ім. М.П. Драгоманова, 2012. С. 466–469.
8. Шлімакова І.І. Формування екологічної свідомості молоді в контексті екопсихологічної концепції «Я-відношення» В.О. Скребця. Актуальні проблеми психології: зб. наук. пр. Т. 7. Екологічна психологія / Ін-т психології ім. Г.С. Костюка АПН України. Житомир, 2009. Вип. 20, ч. 2. С. 280–284.

УДК 579.864.1:615.331

PRESERVATION VIABILITY OF THE CELLS AS GUARANTY OF QUALITY OF PROBIOTIC PREPARATIONS

V. Cherepanskyi, N. Hrehirchak
National University of Food Technologies

Key words:
Probiotic drugs
Domestic probiotics
Freeze drying

Article history:
Received 03.10.2019
Received in revised form 19.10.2019
Accepted 13.11.2019

Corresponding author:
N. Hrehirchak
E-mail:
g_natal@ukr.net

ABSTRACT

Nowadays in Ukraine there are problems of diseases of the gastrointestinal tract of different etiology. As a result of the decrease in the level of probiotics trains, in particular bifidobacteria and lactobacilli, digestive processes and the course of many basic biochemical processes in the body are disturbed, which in turn worsens the general condition of the organism and decreases its resistance to pathogenic and opportunistic microorganisms.

The main ways of prevention and treatment of diseases of the gastrointestinal tract are drugs belonging to the group of probiotics, the use of which allows to improve and restore the microflora of the intestine and mucous membranes of the human body, which leads to general improvement of health and prevents the development of chronic diseases.

Probiotics are quite widespread in the pharmaceutical market of Ukraine. However, overseas preparations occupy almost the entire market. Therefore, the production of domestic probiotics is an urgent task, since their main advantage is the adaptability of the strains of microorganisms used in them to the Ukrainian population.

Probably the most important stage in the production of probiotic preparations is the stage of drying. After all, this stage affects the final characteristics of the drug, such as the number of viable cells and shelf life of the drug. Significantly enhances cell survival during drying with a properly selected protective medium, but it is also important to properly select the drying process and the equipment for carrying it out. The most effective way of drying is freeze drying. Although there are potentially cheaper and faster drying methods such as spray drying, vacuum drying, and fluidized drying, none can match sublimation drying when it comes to maintaining cell viability.

DOI: 10.24263/2225-2924-2019-25-6-3

ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ЯК ЗАПОРУКА ЯКОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

В. В. Черепанський, Н. М. Грегірчак
Національний університет харчових технологій

Останнім часов в Україні дуже гостро постає проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів, зокрема біфідобактерій і лактобацил, порушуються процеси травлення та перебіг багатьох основних біохімічних процесів в організмі, внаслідок чого погіршується загальний стан організму та знижується його стійкість до дії патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів.

Основним засобом профілактики і лікування захворювань шлунково-кишкового тракту є препарати, що належать до групи пробіотиків, використання яких дає змогу покращити та відновити стан мікрофлори кишечника й слизових оболонок організму людини, що приводить до загального покращання стану здоров'я та запобігає розвитку цілої низки хронічних захворювань.

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко. Проте препарати закордонного виробництва займають майже весь ринок. Тому виробництво вітчизняних пробіотиків — актуальне завдання, оскільки їхньою принциповою перевагою є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення.

Чи не найголовнішим етапом виробництва пробіотичних препаратів є стадія висушування. Адже саме цей етап впливає на кінцеві характеристики препарату, такі як кількість життєздатних клітин і термін зберігання препарату. Значно підвищує виживання клітин під час сушіння правильно підібране захисне середовище, але й важливо правильно обрати процес сушіння та обладнання для його проведення. Найбільш ефективним способом сушіння є сублімаційна сушка (ліофілізація). Незважаючи на те, що існують потенційно дешевші та швидші методи висушування, такі як сушіння розпиленням, вакуумна сушка й сушка в киплячому шарі, жоден не може відповідати сублімаційній сушці, якщо мова йде про підтримку життєздатності клітин.

Ключові слова: *пробіотичні препарати, вітчизняні пробіотики, сублімаційна сушка.*

Постановка проблеми. Поширеність хвороб органів травлення (ХОТ) на сучасному етапі надзвичайно широка [1], а їх повсюдно зростаюча частота захворюваності оцінюється як епідемія. І у світі, і в Україні показники захворюваності на ХОТ прогресивно зростають, подвоюючись щодесятиліття. У структурі поширеності захворювань в Україні ці патології знаходяться на третьому місці, у структурі смертності — на четвертому [2].

Одне з провідних місць у структурі захворювань шлунково-кишкового тракту за тяжкістю перебігу, частотою ускладнень і летальності займають хронічні запальні захворювання кишечника, до яких у наш час відносять не-

специфічний виразковий коліт, хворобу Крона, синдром подразненого кишечника та ін. [1]. Ці хвороби мають періоди загострень і ремісій [3].

Актуальність проблеми визначається також значним поширенням хвороб органів травлення серед дітей та підлітків і не завжди задовільними результатами лікування. За останні два десятиліття одним із наслідків несприятливих змін у різних сферах життєдіяльності суспільства стало погіршення здоров'я дітей, у тому числі зростання хронічних форм соматичної патології. В Україні до 60% дитячого населення страждає від різних соматичних хвороб, причому захворюваність продовжує зростати [1].

Не менш поширеними є запальні захворювання статевих органів у жінок. За статистичними даними, вони займають перше місце серед усіх гінекологічних захворювань і є однією з причин порушення дітородної функції жіночого організму [4]. У таблиці 1 узагальнено кількість хворих за згаданими вище захворюваннями серед відповідних груп населення України.

Таблиця 1. **Поширеність захворювань серед відповідних груп населення,** млн осіб [1; 2; 4]

Захворювання за групами населення	Хворі	Здорові
Захворювання кишечника серед дітей	7 206	7 592 794
Захворювання кишечника серед дорослого населення	269 367	34 240 633
Запальні захворювання статевих органів серед жінок	275 754	22 382 832

У комплексній терапії вищезгаданих захворювань провідну роль відіграють пробіотичні препарати, ефективність яких залежить від біологічних властивостей бактерій виробничих штамів, що входять до їх складу. Наявність у пробіотиків високої антагоністичної активності щодо умовно-патогенних бактерій і помірно виражений рівень адгезивної активності є необхідними чинниками, що забезпечують порівняно швидке якісне і кількісне відновлення популяції аутофлори пацієнта, зокрема індикаторних видів лакто- і біфідобактерій [5].

Метою статті є дослідження ринку пробіотичних препаратів України та обґрунтування оптимального способу висушування пробіотиків для збереження максимальної кількості живих клітин.

Викладення основних результатів дослідження. Пробіотичні препарати на основі штамів лактобацил найбільш широко застосовують у клінічній практиці. Зазначені препарати призначаються при:

- хронічних колітах різної етіології, зокрема неспецифічних виразкових колітах, соматичних захворюваннях, ускладнених дисбактеріозами;
- в акушерсько-гінекологічній практиці для санації статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій і передпологовій підготовці вагітних групи «ризику» 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 статевої сфери (бактеріальних вагінозів, у тому числі у вагітних, бактеріальних кольпітів, викли-

каних стафілококом та кишковою паличкою, сенільних кольпітів гормональної природи) [6].

На українському ринку лікарських препаратів переважають імпортні пробіотики. Так, станом на 1 січня 2016 року ринок пробіотиків мав такий вигляд: Німеччина — 20%; Словенія — 10%; Італія — 10%; Польща — 7%; Грузія —3%; Індія — 7%; Україна —16%; Канада — 17%; Франція —10%.

Як видно, закордонні фірми займають близько 80% українського фармацевтичного ринку в цій сфері. Станом на 1 січня 2016 року до Державного реєстру лікарських засобів України включено 30 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: ЗАТ «Партнер» (Росія), ТОВ «Бакорен» (Росія), «Віта-фарма» (Росія), «Мікроген» (Росія), НВРУП «Діалек» (Білорусь), «Pharmachion» (Болгарія), «Ferrosan» (Данія), «Institut Rosell Inc.» (Канада), «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «GenomBiotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Франція), «Mili Healthcare» (Велика Британія), «Merckle» (Німеччина).

Українська фармацевтична лінія пробіотичних препаратів представлена виробниками: ДП «Ензим» (Україна) — 1 препарат, ПрАТ «Біофарма» (Україна) — 4 препарати. Лікарські препарати цієї фармакотерапевтичної групи представлені на ринку України у вигляді таких лікарських форм: порошки, краплі, таблетки й капсули [6].

Наразі, станом на 1 жовтня 2019 року, закордонні фірми займають весь український фармацевтичний ринок в цій сфері, і до Державного реєстру лікарських засобів України включено 18 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «GenomBiotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Італія), «Merckle» (Німеччина) [7].

Проведений аналіз асортименту лікарських засобів досліджуваної групи показав, що переважно це препарати, які містять біфідобактерії — 8%, колібактерії — 8% та лактобактерії — 32%, а також дріжджі — 27% [6].

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко і різняться за своїм складом та призначенням. За складом вони поділяються на монопробіотики та комплексні пробіотики. Монокомпонентні препарати — це монокультури живих мікроорганізмів, які містять представників нормальної мікрофлори кишечника. Перевагою монопробіотиків порівняно з іншими групами пробіотиків є те, що вони затримуються в організмі людини на триваліший період часу, що значно підвищує лікувальний ефект. Це пов'язано з тим, що використовувані мікроорганізми виявляються в усіх біотопах травного тракту.

Найбільш поширеними групами пробіотичних мікроорганізмів, які використовуються для виробництва монопробіотиків, є представники родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. Порівняно з біфідобактеріями, лактобактерії мають високу адгезію до слизових оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару, завдяки чому вони особливо важливі при патології шлунково-кишкового тракту та урогенітального тракту. Встановлено, що деякі види лактобактерій знижують ризик утворення каменів у нирках завдяки оксалат-модифікуючій активності [6].

Основою пробіотиків є живі клітини мікроорганізмів, адаптовані до певних умов існування, що досить сильно реагують на їх зміну. Симбіотична мікро-

флора людей, які проживають в регіонах з різними кліматичними умовами, раціонами харчування, не є абсолютно однаковими. Тому слід враховувати тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом.

Тобто найбільш високу ефективність проявляють пробіотики, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів. Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення. Тому створення пробіотиків на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори є актуальним і важливим завданням [8].

Технологічний процес виготовлення пробіотичних препаратів охоплює приготування посівного матеріалу, виробничий біосинтез, змішування культуральної рідини із захисним середовищем, розлив, сушіння пробіотичної маси, герметизація напівпродукту, пакування готової продукції, маркування і відвантаження. Зважаючи на те, що клітини бактерій у пробіотичних препаратах повинні бути живими, одним із головних питань, що стосуються рецептури пробіотиків, є втрата їх життєздатності після сушіння та під час зберігання. Наявність достатньої кількості життєздатних мікроорганізмів у складі пробіотичних препаратів вважається істотним критерієм їхньої якості. Для підвищення тривалої стійкості пробіотиків важливо зберегти їх у сухому вигляді зі зниженим рівнем вологи. Для сушіння пробіотиків можна виділити кілька методів, включаючи розпилювальну сушку, ліофільну сушку та вакуумну сушку, проте виживання мікроорганізмів при застосуванні різних методів сушіння різниться (табл. 2).

Таблиця 2. **Залежність виживання клітин від методу сушіння та способу їх захисту [9]**

Метод сушіння	Спосіб підвищення життєздатності	Культура мікроорганізмів	Життєздатність клітин без застосування способу, %	Життєздатність клітин із застосуванням способу, %
1	2	3	4	5
Розпилювальна сушка	Зниження температури на виході з 80°С до 60°С	*S. thermophilus* МК-10 та *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 151	12,7 8,0	69,5 22,1
Розпилювальна сушка	Використання азоту замість повітря	*L. lactissubsp. cremoris* ASCC930119	45,19	58,58
	Слабке осмотичне навантаження (0,3М NaCl, 30 хв) перед сушінням	*L. paracasei* NFBC	8,27	33,46
	Попередня обробка теплом (52°С, 30 хв)		4,3	24

Продовження таблиці 2.

1	2	3	4	5
Сублімаційна сушка	Додавання до середовища сахарози	*L. helveticus*	10	50
	Додавання до середовища знежиреного молока та трегалози	*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081	3	70
	Зниження температури заморожування	*L. brevis* (з –20°C до –60°C)	46,4	65,2
		L. salivarius I24 (з –30°C до –80°C)	44,35	65
Вакуумна сушка	Додавання до середовища сорбіту	*L. paracasei* F19	29	54
	Додавання до середовища трегалози	*L. acidophilus*	18,9	37,9
	Додавання до середовища гліцерину		15,4	29,5

Сублімаційна сушка, також відома як ліофілізація, є найбільш зручним і широко застосовуваним способом видалення води для підвищення стабільності зберігання пробіотиків [9]. Порівняно з іншими методами сушіння, такими як розпилювальна сушка, ліофілізація є дорогим процесом через порівняно високі витрати на інвестиції, експлуатацію й обслуговування, але процес ліофільної сушки надає багато переваг у результатах, отриманих з точки зору життєздатності, якості та часу зберігання пробіотичних культур. Ліофільна сушка також має переваги з точки зору характеристик кінцевого продукту, таких як стабільність у його складі, неушкодженість поживних речовин, зниження хімічної деградації, контроль кінцевої вологості та зменшення вмісту води в кінці процесу до дуже низьких рівнів. Сушка ліофілізацією — це процес, коли вода або інший розчинник заморожуються з подальшим її вилученням із зразка на завершальних стадіях ліофілізації. Цей процес поєднує в собі три етапи: (1) зразок заморожується при низькій температурі, (2) первинна сушка відбувається, коли лід сублімується під зниженим тиском, і (3) вторинна сушка відбувається як етап десорбції, де видаляється залишкова волога або її зниження до низького рівня [10].

Усі ці етапи відбуваються в сублімаційних сушарках, основними складовими яких є:

- сушильна камера, де відбувся процес ліофілізації, має форму циліндра з декількома арматурними ребрами для міцності. Камера та дверцята виконані з нержавіючої сталі. Камера містить як полиці для продукції, так і конденсатор пари, який розташовується збоку. Камера оснащена клапанами підключення вакуумної лінії, зливом і спуском вакууму. Камера має двоє дверцят на кожному кінці. Одні призначені для завантаження/вивантаження продукції, інші знаходяться на кінці конденсатора;

- полиці та вагонетки. Певна кількість «модулів» складається з декількох полиць, які призначені для завантаження виробів. Продукт поміщають у лотки, які завантажують на нагрівальні плити (полиці) в камеру апарата;

- конденсатор пари. Конденсатор пари розміщений у задній частині камери або нижній частині і побудований з круглої трубки діаметром 25 мм. Охолодження конденсатора пари відбувається шляхом прямого розширення. Розморожування накопиченого льоду з конденсатора пари відбувається водою, тож для пришвидшення циклу розморожування рекомендується використовувати гарячу воду.

Вакуумна система сублімаційної сушарки складається із сушильної камери, конденсатора, вакуумних труб, клапанів і резервного та утримуючого насосів. Вакуумна система є важливою для швидкої сублімації. У системі обігріву теплові плити охолоджуються і нагріваються теплоносієм. Це рідина, яка може бути охолодженою або нагрітою для забезпечення заморожування або нагрівання продукту під час циклу сушіння. Електричний котел безпосередньо нагріває рідину, а охолодження відбувається через проміжний теплообмінник. Відцентровий насос забезпечує примусову циркуляцію теплоносія [11].

Різні параметри процесу також можуть значною мірою впливати на життєздатність пробіотичних мікроорганізмів під час сушіння в ліофільному режимі, при цьому температура, за якої вони заморожуються, є ключовим параметром. В ряді досліджень показано, що чим нижча ця температура, тим кращі результати життєздатності [12].

Висновки

Отже, зважаючи на те, що ринок пробіотиків України майже повністю зайнятий продукцією закордонного виробництва, актуальним завданням є розширення ринку за рахунок виробництва конкурентоспроможних вітчизняних пробіотичних препаратів. Головною перевагою цих перпаратів є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення, що значно підвищує їхню ефективність порівняно з імпортними пробіотиками.

Пробіотики, виготовлені з моноштамових культур, характеризуються тривалішим лікувальним ефектом унаслідок того, що пробіотичні культури затримуються в організмі людини на триваліший період часу.

При цьому для збереження кількості живих клітин у складі пробіотичних препаратів і стабільності у процесі зберігання важливим є вибір відповідної техніки сушіння, яке є невід'ємним етапом їх виробництва. Найбільш високі показники за кількістю життєздатних клітин після процесу висушування та стабільності характеристик кінцевого продукту дає використання сублімаційної сушки. Незважаючи на те, що це дорогий і трудомісткий серійний процес, якість отриманого продукту знаходиться на достатньо високому рівні.

Література

1. Степанов Ю. М., Скирда І. Ю., Петішко О. П. Хронічні запальні захворювання кишечника: особливості епідеміології в Україні. *Гастроентерологія*. 2017. № 2, Т. 51. С. 97—105.

2. Рингач Н. О., Керецман А. О. Хвороби органів травлення: історичні паралелі змін класифікації та епідеміологічної ситуації. *Семейная медицина*. 2015. № 4, Т. 60. С. 137—141.

3. Життя по хвилинах: що потрібно знати про запальні захворюваннях кишечника? URL: https://ua.interfax.com.ua/news/press-release/587596.html (дата звернення: 20.09.2019).

4. Жилка Н. Я., Миронюк І. С., Слабкий Г. О. Характеристика деяких показників репродуктивного здоров'я жіночого населення України. *Лікарські відомості*. 2018. № 9, Т. 71. С. 1803—1808.

5. Лях В. Р., Червецова В. Г., Кричковська А. М. Пробіотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту. *CTAS*. 2018. № 1. Вип. 1. С. 72—77.

6. Хижняк О. С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: Автореф. дис. … канд. фарм. наук. *Харків*. 2016.

7. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&atscode=A07FA (дата звернення: 01.10.19).

8. Янковский Д. С., Моисеенко Р. А., Дымент Г. С. Особенности отечественных мультипробиотиков. *Современная педиатрия*. 2009. Т. 25. № 3. С. 79—86.

9. Broeckx G., Vandenheuvel D., Claes IJ., and other. Drying techniques of probiotic bacteria a sanimportant step to wards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm*. 2016. № 505. P. 303—318.

10. Conde-Islas A., Jiménez-Fernández M., Cantú-Lozano D., and other. EffectoftheFreeze-Drying Processonthe Physicochemicaland Microbiological Propertiesof Mexican Kefir Grains. *Processes*. 2019. № 3, Vol. 7.

11. Vacuum freeze dryer (FD series). URL: https://www.liofilizador.com/upload/file/1561029497.pdf (дата звернення: 03.10.19).

12. Fenster K, Freeburg B, Hollard C, and other. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*. 2019. № 3, Vol. 7.

В.Черепанский, К.Покойовец, Н. Грегирчак,доц., канд. тех. наук
(НУПТ, г. Киев)

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСТНОСТИ ХЛЕБА

Введение. Безопасность и качество продуктов является краеугольной проблемой для населения земного шара и они тесно связаны с современным состоянием научно-технического прогресса в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, торговли, питании, медицине и т.д. [1,2,3]. Одним из приоритетных направлений пищевых технологий является предотвращение потерь, сохранение качества и обеспечение биологической безопасности продуктов питания на всех стадиях производства и последующего хранения [4]. Порча пищевых продуктов неизбежна - это лишь вопрос времени, которое усиливается внешними факторами. И это один из главных вопросов безопасности пищевых продуктов.

Основная причина порчи большинства пищевых продуктов - развитие микроорганизмов. Они могут попасть в пищевой продукт на любой стадии технологического процесса - в ходе производства, на стадиях упаковки, хранения или реализации [5]. При попадании же в продукт рост и развитие микроорганизмов зависят от многих факторов: их вида и количества; самого продукта и сырья, из которого он произведен; наличия благоприятной среды (воды, температуры, уровня pH, присутствия кислорода и т.д.) и других факторов.Развитие микроорганизмов можно предотвратить или замедлить путем контроля условий производства и хранения, применения антибиотиков, консервантов, бактериоцинов растительного происхождения. Одним из вариантов предотвращения появления и развития не благоприятной микрофлоры на поверхности хлеба является использование упаковки.

Сегодня в качестве упаковки используют самые разнообразные материалы: бумага, картон, целлофан, полимерные и комбинированные материалы. Полимерные упаковки - популярны на рынке, однако они имеют два существенных недостатка: во-первых, полимерные упаковочные изделия изготавливаются из невозобновляемых природных ресурсов (нефти, угля, газа и др.) во-вторых, долговечность пластика, которая до недавнего времени считалась главным достоинством, сегодня является существенным недостатком. Утилизация полимерных упаковочных материалов критически ухудшает экологическое состояние окружающей среды [5,6].

Решением данной проблемы может быть использование биополимеров для производства биоразлагаемой упаковки, которая позволит обеспечить микробиологическую стабильность хлебопекарного изделия. Такие упаковки как съедобные покрытия, которые, дополнительно обогащены активными веществами с антибактериальными и противогрибковыми свойствами, защищают продукты питания от развития вредной микрофлоры [7].

Целью исследования является определение путей контаминации изделий хлебопекарного производства и возможности использования биоразлагаемых пленок для обеспечения микробологической стабильности хлеба.

Материалы и методы исследования. Микробиологическую оценку поверхностей оборудования и одежды персонала проверяли методом смыва. Анализ воздуха производственного помещения проводили седиментационным методом.

Состав биопленки включает модифицированный крахмал с високоамилозних сортов кукурузы, желатин, глицерин (99%) в качестве пластификатора и пробиотическая закваска «Стрептосан Ипровит» (производитель Институт продовольственных ресурсов НААН Украины). Образцы хлеба выпекали безопарным методом, маса каждого образца составляла 250г. Небольшое количество покрытия наносили на поверхность свежеиспеченного хлеба намазыванием (возможно распыление).

Микробиологическую безопасность хлеба проверяли с помощью провокационного тестирования следующим образом. На корку хлеба (приблизительная площадь 36 $см^2$) с покрытием и без покрытия (контрольный образец) наносили по 1 мл предварительно приготовленной суспензии микроорганизмов *Penicillium chrysogenum Ф-7* концентрацией 9,4 $\times 10^4$конидий/мл, *Aspergillus niger P-3* - $3{,}7\times 10^4$ конидий/мл. Образцы помещали в термостат при температуре 28°С. Оценку проводили методом сравнения площади заражения исследуемых образцов хлеба с контролем [7].

Результаты и обсуждение. Известно, что поверхность хлеба после выхода из печи практически стерильная. В процессе охлаждения, транспортировки, хранения возможно его повторное обсеменение микроорганизмами. Хлеб заражается при непосредственном контакте с загрязненными предметами (транспортные и упаковочные средства, руки, одежда персонала) или через воздух. Наибольшей проблемой с точки зрения обсеменения изделий является процесс охлаждения хлеба. В это время на поверхность хлеба оседают $1x10^9$ спор микроорганизмов в минуту [8]. Нами проведено исследование воздуха помещения хлебопекарного производства контактируемого с готовым продуктом с целью определения критических зон попадания неблагоприятной микрофлоры. Результаты анализа представлены на рис.

Рисунок

Исследование воздуха производственного помещения

Анализ результатов показал, что количество микроорганизмов в воздухе исследуемых зон предприятия не только превышает норму (500 КОЕ/$м^3$), но и значительно обсеменено спорами плесневых грибов.

При анализе поверхностей хлебопекарного производства наибольшее количество микроорганизмов обнаружили на поверхности лотка из дерева (> 75 КОЕ/$см^2$) и лотка из пластика (> 30 КОЕ/$см^2$) используемых для охлаждения и транспортировки хлеба. Причем на поверхности деревянного лотка преобладают плесневые грибы, а на поверхности пластикового – бактерии, что объясняется различными адгезивными свойствами клеток. При исследовании поверхности одежды персонала и их рук не обнаружено *БГКП*. На ножах хлеборезательной машины КМАФаМ составляло $1{,}4 \cdot 10^3$ КОЕ/$см^2$, что свидетельствует о недостаточной обработке поверхностей.

Это свидетельствует о плохой вентиляции и циркуляции воздуха в помещении и высоком риске вторичного обсеменения продукции.

Для предотвращения развития микробиоты проводи провокационное тестирование хлеба покрытого пробиотической пленкой и без нее. Проверяли свежеиспеченный хлеб и после суточного хранения. Площадь поражения измеряли через 48 ч, поскольку хлеб может храниться более двух суток (табл.).

Анализ данных табл. показал, что площадь заражения свежеиспеченного хлеба и хлеба после суточного хранения с добавлением пробиотической закваски меньше на 25-48 % по сравнению с контрольным образцом хлеба без покрытия. Это можно объяснить высокой антагонистической активностью молочнокислых бактерий в составе пленки к плесневым грибам [7].

Таблица

Провокационное тестирование корочки хлебобулочного изделия, зараженного тест-штаммами плесени

Тест-культура	Образец	Площадь заражения свежеиспеченного хлеба, $см^2$	Площадь заражения хлеба после суточного хранения, $см^2$
Aspergillus niger P-3	Контроль без покрытия	12,6±0,3	13,8±0,3
	образец с покрытием	7±0,2	9,6±0,2
Penicillium chrisogenumФ-7	Контроль без покрытия	8±0,2	12,6±0,3
	образец с покрытием	5,7±0,2	4,9±0,1

Выводы. Для изготовления конкурентоспособной продукции необходимо обеспечить на предприятии не только хорошее техническое оснащение, но и соответствующее санитарное состояние. Особое внимание нужно обращать на воздухоподготовку, чистоту тары и упаковочных материалов как источников вторичной контаминации хлеба.

Отмечено, что использование покрытия с пробиотической закваской для хранения хлеба, позволяет предупредить развитие плесени в сроки рекомендованые для реализации.

Список использованной литературы

1. *Брулевич В. В.* Безпечність харчових продуктів за законодавством України та Європейського Союзу //Судова апеляція. Цивільне право і цивільний кодекс. – 2016. – №2. – С. 75-83.
2. Римская декларация о всемирной продовольственной безопасности и План действий Всемирной встречи на вишем уровне по проблемам продовольствия [Електронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.g20civil.com/ru/documents/205/577.
3. Про основи національної безпеки України: закон України // ВВР України. – 2003. – № 39. – Ст. 351.
4. *Белецкая Н.М., Удалова Л.П., Пашенцева Л.П.* Инновационные направления развития рынка хлебобулочных изделий //Вестник Белгородского университета кооперации, экономики и права. – 2016. – № 2. – С. 63-69.
5. *Іванов С.В., Пасічний В.М., Маринін А.І.* Перспективні елементи активного пакування // Упаковка. – 2014. – №6. – С. 16 – 18.
6. *Пугаченко О.Б.* Особливості хлібопекарного виробництва та їх вплив на склад і облік запасів // Економічні науки. – 2009. – В.15. – ст. 310-319.
7. *Покойовець К.Ю., Росик О.О., Грегірчак Н.М.* Покриття з пробіотичною закваскою для виробів хлібопекарської промисловості //Біологічні дослідження – 2018. – ст. 329-330.
8. *Науменко Н. В., Калинина И. В.* Анализ направлений развития рынка хлебобулочных изделий //Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2014. – № 4. – С. 11-16.

УДК: 616.2:316-092.9:579.861.2

ВИКОРИСТАННЯ ВІТЧИЗНЯНИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ В РОЗРОБЦІ УКРАЇНСЬКИХ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРТІВ

Черепанський В.В., Грегірчак Н.М.
Національний університет харчових технологій

Вступ. Сьогодні проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології дуже поширена серед населення України. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів порушуються процеси травлення та перебіг багатьох основних біохімічних процесів в організмі, внаслідок чого погіршується загальний стан організму та знижується його стійкістьдо дії патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Важливу роль серед засобів профілактики і лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, є препарати, що належать до групи пробіотиків. Наявність у пробіотиків високої антагоністичної активності щодо умовно-патогенних бактерій і помірно виражений рівень адгезивної активності є необхідними чинниками, що забезпечують порівняно швидке якісне і кількісне відновлення популяції аутофлори пацієнта, зокрема індикаторних видів лакто- і біфідобактерій.

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко. Проте препарати закордонного виробництва займають майже весь ринок. Тому виробництво вітчизняних пробіотиків є актуальних завданням, так як їх принциповою перевагою є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення.

Метою роботи є дослідження ринку пробіотичнихперпаратів України та обґрунтування щодо використання вітчизняного штаму лактобацил у розробці українського пробіотика.

Виклад основного матеріалу. Пробіотичні препарати на основі штамів лактобацил найбільш широко застосовують в клінічній практиці. Зазначені препарати показані при:

- хронічних колітах різної етіології, зокрема неспецифічних виразкових колітах, соматичних захворюваннях, ускладнених дисбактеріозами;
- в акушерсько-гінекологічній практиці для санації статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій та передпологовій підготовці вагітних групи "ризику" 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 статевої сфери (бактеріальних вагінозів, у тому числі у вагітних, бактеріальних кольпітів, викликаних стафілококом та кишковою паличкою, сенільних кольпітів гормональної природи).

На українському ринку лікарських препаратів переважають імпортні пробіотики.Так, станом на 1 жовтня 2016 року ринок пробіотиків мав наступний вигляд (див. рис. 1) [4]:

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

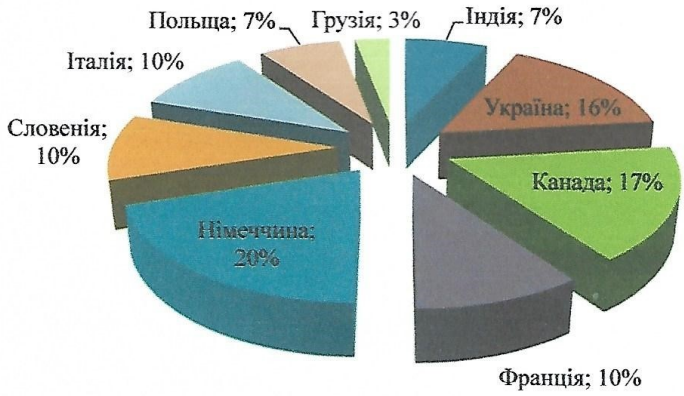


Рис. 1. Виробники пробіотичних лікарських препаратів, представлених на фармацевтичному ринку Україністаном на 1 жовтня 2016 року.

Як видно з рис. 1, закордонні фірми займають біля 80 % українського фармацевтичного ринку в цій області. Станом на 1 січня 2016 року, до Державного реєстру лікарських засобів України включено 30 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: ЗАТ «Партнер» (Росія), ТОВ «Бакорен» (Росія), «Віта-фарма» (Росія), «Мікроген» (Росія), НВРУП «Діалек» (Білорусія), «Pharmachion» (Болгарія), «Ferrosan» (Данія), InstitutRosellInc. (Канада), «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «GenomBiotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Франція), MiliHealthcare (Великобританія), «Merckle» (Німеччина).

Українська фармацевтична лінія пробіотичних препаратів представлена виробниками: ДП «Ензим» (Україна) – 1 препарат, ПрАТ «Біофарма» (Україна) – 4 препарати. Лікарські препарати даної фармакотерапевтичної групи представлені на ринку України у вигляді таких лікарських форм: порошки, краплі, таблетки й капсули[4].

Наразі, станом на 1 жовтня 2019 року, закордонні фірми займають весь український фармацевтичний ринок в цій області, і до Державного реєстру лікарських засобів України включено 18 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «GenomBiotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Італія), «Merckle» (Німеччина) [2].

Проведений аналіз асортименту лікарських засобів досліджуваної групи показав, що переважно це препарати, які містять біфідо-, колі- та лактобактерії, а також дріжджі (див. рис. 2).

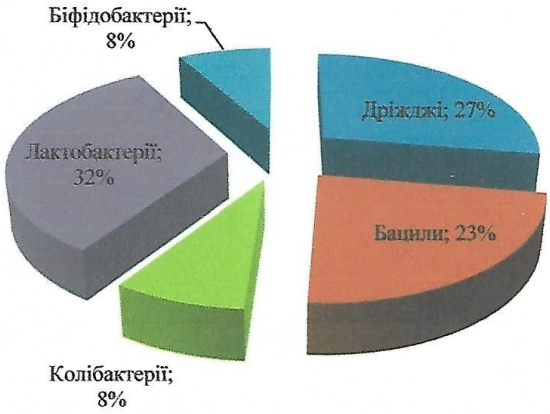


Рис 2. Складові пробіотичних препаратів на фармацевтичному ринку України.

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко і різняться за своїм складом та призначенням. За складом вони поділяються на монопробіотики та комплексні пробіотики. Монокомпонентні препарати – це монокультури живих мікроорганізмів, які містять представників нормальної мікрофлори кишечнику. Перевагою монопробіотиків у порівнянні з іншими групами пробіотиків є те, що вони затримуються в організмі людини на триваліший період часу, що значно підвищує лікувальний ефект. Це пов'язано з тим, що використовувані мікроорганізми виявляються в усіх біотопах травного тракту.

Найбільш поширеними групами пробіотичних мікроорганізмів, які використовуються для виробництва монопробіотиків є представники родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. У порівнянні з біфідобактеріями, лактобактерії мають ряд переваг. Лактобактерії мають високу адгезію до слизових оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару, завдяки чому вони особливо важливі при патології шлунково-кишкового тракту та урогенетального тракту. Встановлено, що деякі види лактобактерій знижують ризик утворення каменів у нирках, завдяки оксалатмодифікуючій активності[4].

Основою пробіотиків є живі клітини мікроорганізмів, адаптовані до певних умов існування та досить сильно реагують на їх зміну. Симбіотична мікрофлора людей, які проживають в регіонах з різними кліматичними умовами, раціонами харчування не є абсолютно однаковими. Тому слід приймати до уваги тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом. Тобто, найбільш високу ефективність проявляють пробіотики, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів.

Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення. Тому, створення пробіотиків на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори є актуальним та важливим завданням [3].

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Перспективним є використанння штаму*Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (УКМ). Цей штам було виділено з шлунково-кишкового тракту людей-довгожителів у 1978–1981 роках під час міжнародної геронтологічної експедиції до високогірних селищ Абхазії – регіону з високим рівнем довголіття. Цей штам володіє пробіотичними властивостями та характеризується високою біологічною активністю.

При культивуванні цього штаму рекомендовано додавати у середовище глинисті мінерали, зокрема каолініт [1]. За його додавання спостерігається збільшення питомої швидкості росту даного штаму у 5,2 рази, у порівнянні з культивуванням на звичайному середовищі MRS без мінералу. Також наявність каолініту уповільнює процес зниження pH середовища. Різниця між значенням pH середовища з 4 % каолініту на початку культивування і через дві години (ΔpH) була в 10 разів меншою в порівнянні з контролем.

Висновки. Отже,зважаючи на те, що ринок пробіотиків України майже повністю зайнятий продукцією закордонного виробництва, актуальним завданням є розширення ринку за рахунок виробництва конкурентоспроможних вітчизняних пробіотичних препаратів. Головною перевагою цих перпаратів є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення, що значно підвищує їх ефективність порівняно з імпортними пробіотиками.

Пробіотики, що виготовлені з моноштамових культур характеризуються тривалішим лікувальним ефектом внаслідок того, що пробіотичні культури затримуються в організмі людини на триваліший період часу. Штам *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (УКМ) завдяки тому, що по-перше, є вітчизняним пробіотичним штамом, а по-друге, характеризується високою біологічною активність, може бути використаний у розробці пробіотичного препарату.

Список літератури

1. *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 *invitro* // Мікробіол. журн. – 2016. – №4, Т.78. – С. 11 – 24.
2. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&atscode=A07FA
3. *Янковский Д. С., Моисеенко Р. А, Дымент Г. С.* Особенности отечественных мультипробиотиков // Современная педиатрия. – 2009. - №3, т. 25. – С. 79 – 86.
4. *Хижняк О. С.* Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: Автореф. дис.канд. фарм. наук. – Харків, 2016. – 195 с.

10. Розробка сухої швидкорозчинної форми дієтичної добавки для запобігання дефіциту кальцію та ряду інших макро- та мікроелементів

Вячеслав Черепанський[1], Наталія Сімурова[1], Олексій Сімуров[2]
[1]*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*
[2]*ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка НАМН України», Київ, Україна*

Вступ

Аналіз літературних даних свідчить, що найбільший вплив на стан здоров'я людини здійснюють такі макро- та мікроелементи як кальцій, магній, залізо, йод, селен, цинк. Проте традиційне харчування в Україні та питна вода часто не забезпечують їх добової потреби.

Матеріали та методи

Лабораторний однопуансонний таблет-прес фірми «Korsch», лабораторний ротаційний подрібнювач, електронні технічні ваги ТВЕ-0,5 («Техноваги»), аналітичні ваги АДВ-200М, скляний та фарфоровий хімічний посуд, хімічні реактиви.

Результати

Основою більш, ніж 90 % представлених на ринку препаратів кальцію є $CaCO_3$. Суттєвим їх недоліком є те, що всмоктування кальцію відбувається тільки після утворення розчинного хлориду кальцію в результаті взаємодії $CaCO_3$ з хлоридною кислотою в шлунку. Таким чином засвоюється не більше 10% кальцію, до того ж при довготривалому застосуванні відбувається зниження pH шлункового соку, що є небажаним для людей зі зниженою кислотністю, в першу чергу, для людей похилого віку. Таких недоліків не мають препарати, основою яких є цитрат кальцію. Ґрунтуючись на цьому, нами були розроблені кальцієвмісні швидкорозчинні шипучі таблетки. Основними ідеями при їх створенні було:

- по-перше, цитрат кальцію має утворюватись в результаті взаємодії компонентів препарату: оксиду (або гідроксиду) кальцію і лимонної кислоти, безпосередньо під час розчинення таблетки – такий підхід значно знижує собівартість отриманого продукту;

- по-друге, ці таблетки повинні були стати носієм для доставки інших мікро- та макроелементів: йоду, селену магнію, цинку та заліза в організм людини і забезпечити споживачу половину їх добової потреби.

Нами підібрані інші допоміжні речовини: лактоза, крохмаль, полівініпіролідон, КМЦ, аеросил, натрію стеарат, необхідні з технологічної точки зору, зокрема для розподілу мікродомішок, поліпшення пресувальних властивостей тощо. Додавання натрію гідрокарбонату дозволило збільшити швидкість розчинення таблеток, а підсолоджувач (ацесульфам калію) і ароматизатори (апельсинова та м'ятна олії) покращали споживчі властивості.

Висновок

Таким чином, нами були створені ефективні та зручні для широкого кола споживачів і водночас доступні засоби профілактики недостатності макро- та мікроелементів: кальцію, йоду, магнію, феруму, селену та цинку.

УДК 663

В. Черепанский; К. Покойовец;
Н. Грегирчак, доц., канд. тех. наук (НУПТ, г. Киев)

ОЦЕНКА САНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ХЛЕБОПЕКАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Введение. В наше время проблема качества продукции на предприятиях хлебопекарной отрасли остается актуальной, поскольку именно качество является одним из важнейших факторов успешной деятельности предприятий, залогом достижения и поддержания их эффективности. Именно поэтому существует необходимость разработки более эффективных методов обеспечения и управления качеством. Одним из способов достижения этого – внедрение системы НАССР, что помогает производителям сконцентрироваться на опасностях, которые влияют на безопасность продуктов питания, а также устанавливать и контролировать предельные значения показателей в критических контрольных точках в ходе производства.

Качество хлебопекарной продукции связано не только с техническим состоянием оборудования предприятия, но и с санитарным состоянием его помещений. Микробиологическая порча хлеба и хлебобулочных изделий связана с жизнедеятельностью микробиоты, которая может попасть на разных этапах производства (непосредственное изготовление, охлаждение, упаковка, транспортировка и др.) и привести к ухудшению их качества. Поэтому для обеспечения качественной и конкурентной продукции необходимо соблюдение чистоты производственных помещений и оборудования [1, 2].

Материалы и методы исследования. Микробиологическую оценку поверхностей оборудования и одежды персонала, проверяли методом смыва. Анализ воздуха производственного помещения проводили седиментационным методом.

Результаты и обсуждение. Поверхность хлеба после выхода из печи практически стерильная. В процессе охлаждения, транспортировки, хранения возможноего повторное обсеменение микроорганизмами. Хлеб заражается при непосредственном контакте с загрязненными предметами (транспортные и упаковочные средства, руки, одежда персонала) или через воздух. Наибольшей проблемой с точки зрения обсеменения изделий является процесс охлаждения хлеба.

При анализе поверхностей наибольшее количество микроорганизмов обнаружили на поверхности лотка из дерева (> 75 КОЕ/см^2) и лотка из пластика (> 30 КОЕ/см^2) используемых для охлаждения и транспортировки хлеба. Причем на поверхности деревянного лотка

преобладают плесневые грибы, а на поверхности пластикового – бактерии, что объясняется различными адгезивными свойствами клеток. При исследовании поверхности одежды персонала и их рук не обнаружено *БГКП*. На ножаххлеборезательной машиныКМАФаМ составляло $1,4 \cdot 10^3$ КОЕ/см^2, что свидетельствует о недостаточной обработке поверхностей.

Анализ воздухаконтактируемого с готовым продуктом, позволяет определять зоны, которые могут повлиять на развитие неблагоприятной микрофлоры. Результатыанализы представлены в таблице.

Таблица – Результаты исследования воздуха производственного помещения

Место исследования воздуха	Общее количество клеток (КОЕ/м^3)	Количество спор плесневых грибов (КОЕ/м^3)
Конец упаковки	$7,6 \cdot 10^2$	70
Охлаждение	$8,8 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^2$
Нарезка	$3,8 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^2$
Выход из печи(1)	$1,8 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^2$
Выход из печи(2)	$1,1 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^2$

Анализ данных таблицы показал, чтоколичествомикроорганизмов в воздухе исследуемых зон предприятия превышает норму (500 КОЕ/м^3). Это свидетельствует о плохой вентиляции и циркуляциивоздуха в помещении и высоком риске вторичного обсеменения [2].

Выводы. Для изготовления конкурентоспособной продукции необходимо обеспечить на предприятии не только техническое оснащение, но и соответствующее санитарное состояние. Особое внимание нужно обращать на воздухоподготовку, чистоту тары и упаковочные материалы как источники вторичной контаминации хлеба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пугаченко О.Б. Особливості хлібопекарного виробництва та їх вплив на склад і облік запасів // Економічні науки. – 2009. – В.15. – ст. 310-319.

2. Покойовець К.Ю., Росик О.О., Грегірчак Н.М. Покриття з пробіотичною закваскою для виробів хлібопекарської промисловості // Біологічні дослідження – 2018. – С. 329-330.

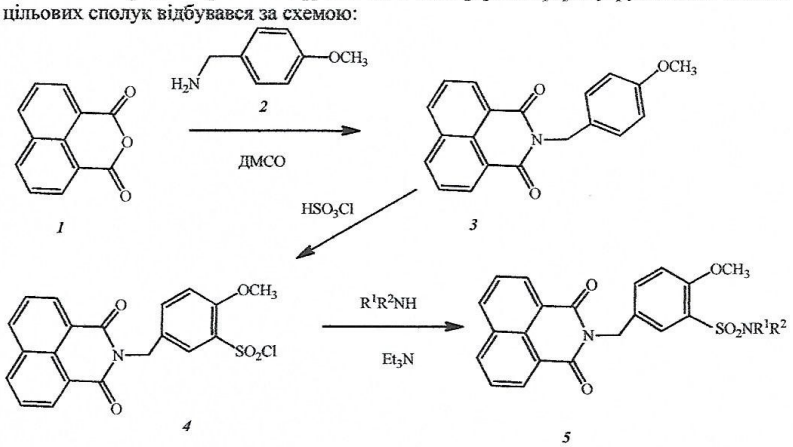
3 Синтез нових похідних нафталевої кислоти

Вячеслав Черепанський
Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ.У похідних нафталевої (1,8-нафталендикарбонової) знайдені оригінальні флуоресцентні, фотофізичні та електрохімічні властивості, а також широкий спектр біологічної активності. Робота з функціональними похідними 2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діонів зосереджена як на синтезі нових сполук цієї групи, так і на пошуку нових галузей їх застосування.

Матеріали і методи.Застосовано методи органічного синтезу з комерційно доступного нафталевого ангідриду. Усі органічні аміни та розчинники використовувались після додаткового очищення та осушування. Спектри ЯМР ^{1}H зареєстровані на приладі "Varian VXR-300", робоча частота – 300 МГц, внутрішній стандарт – ТМС в розчині ДМСО-d_6.

Результати.Метою роботи був синтез нових, невідомих раніше сульфаніламідів, що містять поряд з нафталевим фрагментом інші фармакофорні угруповання. Синтез цільових сполук відбувався за схемою:



Нафталевий ангідрид *1* реагує з 4'-метоксибензиламіном *2* з утворенням 2-(4'-метоксибензил)-2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діону *3*. Нами з'ясовано, що сульфохлорування відбувається селективно з утворенням продукту *4*, який взаємодіє з вторинними амінами (морфоліном, піперидином, гексаметиленіміном), утворюючи 2-[4'-метокси-3'-(R-аміносульфоніл)бензил]-2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діони *5* з виходами 62-72%.

Висновок. В результаті проведених досліджень нами знайдені умови для конденсації 1,8-нафталевого ангідриду з 4-метоксибензиламіном та подальшого селективного сульфохлорування продукту цієї реакції. Дією вторинних амінів на 2-(4'-метокси-3'-хлорсульфонілбензил)-2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діон отримані невідомі раніше сполуки, що є перспективними для подальших біологічних досліджень.

УДК 579.678

Черепанський В.В., Грегірчак Н.М.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВИЖИВАННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ У БІОПЛІВЦІ ДЛЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Національний університет харчових технологій
вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601, Україна
e-mail: cherepanscky@ukr.net

Вступ. Найбільша проблема при зберіганні хліба – це його мікробіологічне псування, а саме черствіння та пліснявіння. Основна причина псування - розвиток мікроорганізмів. Вони можуть потрапити в хліб на будь-якій стадії технологічного процесу - в ході виробництва (руки, одяг персоналу та повітря виробничого приміщення), на стадіях упаковки, зберігання або реалізації, і призвести до погіршення його якості. При попаданні ж в хліб зростання і розвиток мікроорганізмів залежать від багатьох чинників: їх виду та кількості; самого хліба і сировини, з якого він зроблений; наявності сприятливого середовища (води, температури, рівня pH, присутності кисню і т.д.) і інших факторів. Розвиток мікроорганізмів можна запобігти або уповільнити шляхом контролю умов виробництва і зберігання, застосування антибіотиків, консервантів, бактеріоцинів рослинного походження [*Пугаченко, 2009*]. Одним з варіантів запобігання появи і розвитку несприятливої мікрофлори на поверхні хліба є використання біодеградабельної упаковки. Використання такого пакування як їстівні покриття, які, будучи додатково збагачені активними речовинами з антибактеріальною і протигрибковою властивостями, дозволить забезпечити мікробіологічну стабільність хлібопекарських виробів[*Покойовець, 2019*].

При створенні біоплівки важливим є вибір її складу та пробіотичних штамів мікроорганізмів, які будуть входити до неї. На ефективність харчового покриття вливає те, на стільки довго можуть у ній зберігати свою життєздатність бактерії. Адже саме пробіотичні штами бактерій забезпечують захист від розвитку мікроорганізмів на поверхні хліба та разом із тим позитивний влив на мікрофлору кишківника. Тому актуальним завданням є підбір не лише складу біодеградабельної упаковки, але і мікроорганізмів, які б тривалий час зберігали свою життєздатність.

Метою роботи є дослідження виживання мікроорганізмів у складі їстівного покриття при зберіганні.

Матеріали і методи дослідження. У ході роботи досліджували виживання бактерій *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus plantarum*, які мають пробіотичні властивості у біоплівці складу: модифікований картопляний крохмаль, желатин та гліцерин як пластифікатор.

Їстівне покриття отримували шляхом змішування модифікованого крохмалю, желатину, води та гліцерину з подальшим нагріванням суміші при 80-85 °С протягом 30 хв, для того, щоб забезпечити повне розчинення та гідратацію. Потім розчин охолоджували до 30°С та додавали пробіотичні бактерії у вигляді сирої біомаси.

Кількість бактерій *Streptococcus thermophilus* визначали глибинним висівом на гідролізований агар, а бактерії *Lactobacillus plantarum* визначали глибинним висівом на середовище MRS. Культивування проводили за температури 37°С протягом 3 діб. Посів здійснювали через 24 год після приготування плівки, 72 год, 120 год зберігання.

Результати і обговорення. Їстівні покриття сьогодні є перспективним напрямом в технології пакування, адже такі покриття дозволять знизити втрати і забезпечити якість та безпеку харчових продуктів в процесі транспортування, зберігання і реалізації. Вчені звертають увагу на створення захисних покриттів які не тільки дозволяють подовжити терміни зберігання, а й збагачують продукт біологічно активними речовинами. Проте у різних дослідженнях по вивченню їстівних покриттів, мікробіологічні показники практично не досліджувалися, як правило перевіряли тільки фізико-хімічні та органолептичні показники [*Кишеня, 2016*].

Тому нами було перевірено виживання молочнокислих бактерій, які входили до складу харчового покриття (табл. 1).

Таблиця 1

Виживання *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus plantarum* у біодеградабельному покритті при зберіганні

Мікроорганізми	Початкова кількість клітин, КУО/см^2	Період зберігання, діб	Кількість клітин в 1 см^2 біоплівки*, КУО/см^2
Streptococcus thermophilus	1,9·10^8	1	5.8x10^6
		3	4x10^6
		5	2.8x10^6
Lactobacillus plantarum	2,5·10^{10}	1	5.1x10^6
		3	3.7x10^5
		5	7x10^4

Примітка. * стат. рівень значимості $p \leq 0.05$, дослід проводили в двох повторностях та вибирали середнє значення.

З отриманих результатів видно, що кращу виживаємість мають бактерії *Streptococcus thermophilus.* Хоча кількість клітин протягом першого дня знизилась на два порядки, проте подальша кількість життєздатних бактерій у плівці зберігалась на такому ж рівні. Для культури *Lactobacillus plantarum* відмічено, що уже за добу кількість клітин зменшилась на 4 порядки, і при подальшому зберіганні знизилася в середньому на один порядок.

Висновки. Отже, їстівні покриття сьогодні є перспективним напрямом в технології пакування. Їстівна плівка здатна утримувати біологічно активні речовини (макро- і мікроелементи тощо) і, відповідно, збагачувати харчові продукти необхідними нутрієнтами у фізіологічно виправданих кількостях. Крім того, їстівні плівки застосовуються як інгібітори росту патогенів та мікробного псування харчових продуктів. Тому використання в хлібопеченні їстівних плівок і покриттів – новий спосіб збереження чутливих до нагрівання біологічно активних компонентів, в т.ч. пробіотиків.

Отримані нами результати свідчать, що культура *Streptococcus thermophilus* є перпективною для подальшої розробки пробіотичних плівок для харчових продуктів оскільки показує хороше виживання клітин при зберіганні плівки.

УДК 637.146.344

Чудна А. О., Варанкіна О.О., Огурцов О. М.

ВДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ЙОГУРТІВ ПРОДУКТАМИ БДЖІЛЬНИЦТВА

Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут»,
вул. Кирпичова, 2, м. Харків, 61002, Україна
e-mail: ann_chudnaya@ukr.net

Кисломолочні продукти відіграють важливу роль у забезпеченні та підтримці життєдіяльності людини. Серед різноманіття продуктів молочної промисловості значний попит у населення мають йогурти. В останні роки в Україні та закордоном споживачі віддають перевагу комбінованим йогуртам (М. І. Машкін, Н. М. Паріщ, 2006).

86 International scientific conference of young scientist and students
"Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution", April 2–3, 2020.
Book of abstract. Part 1. NUFT, Kyiv.

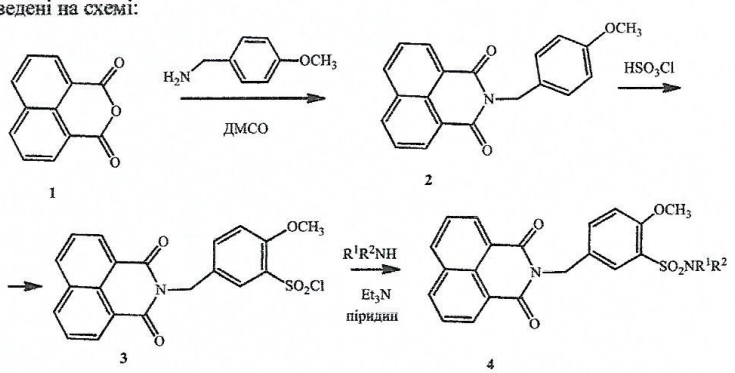
Синтез нових похідних 2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діону

Вячеслав Черепанський, Наталія Сімурова
Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Похідні 2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діону виявляють оригінальні флуоресцентні, фотофізичні та електрохімічні властивості, серед них знайдені біологічно активні речовини, з яких вже впроваджені в практику цитостатичні та протилейкемічні препарати [1]. Метою роботи був пошук нових речовини з високою біологічною активністю для потреб фармацевтичної промисловості.

Матеріали і методи. Для встановлення будови одержаних сполук застосовано методи ЯМР ^{1}Н спектроскопії та елементний аналіз. Спектри зареєстровано на приладі "Varian VXR-300", робоча частота = 300 МГц в розчині ДМСО-d_6, внутрішній стандарт – ТМС.

Результати. Нами знайдені умови для конденсації 1,8-нафталевого ангідриду **1** з 4-метоксибензиламіном та подальшого селективного сульфохлорування продукту цієї реакції. Дією вторинних амінів на продукт сульфохлорування **3** отримані невідомі раніше 2-[4'-метокси-3'-(R-аміносульфоніл)бензил]-2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діони, виходи яких сягають 62-70%. Хімічні претворення наведені на схемі:



Для ідентифікації продуктів реакцій нами був проведений порівняльний аналіз спектрів ЯМР ^{1}Н нафталіміду **1**, продукту сульфохлорування **3** та сульфонамідів **4**.

Висновки. Таким чином, в результаті проведених досліджень нами одержані невідомі раніше похідні 2,3-дигідро-1Н-бензо[de]ізохінолін-1,3-діону, що перспективні для подальших біологічних досліджень.

Структуру продуктів реакції підтверджено даними спектроскопії ЯМР 1Н, а склад – даними елементного аналізу.

Література

1. Bekere L., Gachet D., Lokshin V., Marine W., Khodorkovsky V. (2013), Synthesis and spectroscopic properties of 4-amino-1,8-naphthalimide derivatives involving the carboxylic group. *Beilstein J. Org. Chem.*, 9, pp. 1311–1318.

Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", 2–3 квітня 2020 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1.

Використання пакетиків-саше як первинної упаковки для пробіотичних препаратів

Вячеслав Черепанський, Наталія Грегірчак
Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Якість та ефективність пробіотичних препаратів при зберіганні залежить від початкового вмісту вологи, температури та зведення до мінімуму впливу на них кисню. Тому вибір первинної упаковки є важливим при виробництві пробіотиків для забезпечення стабільності готового лікарського засобу.

Матеріали та методи. Для захисту пробіотичного препарату використовують пакети-саше. Проаналізовано за літературними даними ефективність покриття різного складу при зберіганні пробіотичних препаратів.

Результати та обговорення. Пробіотичні препарати (саме ліофільно висушені) природно гігроскопічні і, як правило, поглинають будь-яку доступну вологу. Тому для первинної упаковки пробіотиків рекомендується використовувати бар'єрні матеріали, які перешкоджають потраплянню вологи та кисню всередину [1].

Саме таким є гнучкий багатошаровий ламінований матеріал з якого виготовляють пакетики-саше. Серед складових, що входять до ламінованого матеріалу саше, наявна алюмінієва фольга різної товщини, яка забезпечує захист від вологи та кисню порівняно зі склом. Волого-бар'єрні властивості полімерів, що входять до покриття, також відіграють важливу роль [2].

Порівняння стабільності пробіотичного препарату за використання різних типів пакетів-саше за температури 25 °С та вологості повітря в межах 60% упродовж 6 міс наведено в табл.

Таблиця. **Стабільність пробіотичного препарату за використання різних типів пакетів-саше [2]**

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

* (склад покриття вказаний від зовнішньої до внутрішньої сторони):

1 тип: папір / поліетилен (PE) / алюмінієва фольга / поліетилен (PE);

2 тип: поліетилентерефталат (ПЕТ) / алюмінієва фольга / поліетилен (ПЕ);

3 тип: поліетилентерефталат (ПЕТ) / алюмінієва фольга / покриття ущільнювачем з сополімером вуглеводневого вінілу (VMCH).

Висновки. Відмічено, що за використання саше типу 1 вміст вологи та кількість життєздатних клітин найбільш стабільні при зберіганні, тому його можна рекомендувати як ефективну первинну упаковку у виробництві пробіотиків.

Література

1. Fenster K., Freeburg B., Hollard C. et al. (2019), the production and delivery of probiotics: a review of a practical approach, Microorganisms, 7 (3): 83.
2. Das S., Bhattacharjee D., Manna A. et al. (2014), Effect of different excipients and packaging materials on commercial preparation of probiotic formulation. Das etal. IJPSR, 5 (5), p. 1830-1836.

УДК 579.678

АНАЛІЗ ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ У БІОДЕГРАДАБЕЛЬНІЙ ПЛІВЦІ

Черепанський В.В.[1], Грегірчак Н.В.[1]

[1]Національний університет харчових технологій

вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601, Україна

cherepanscky@ukr.net

Найбільша проблема при зберіганні хліба – це його мікробіологічне псування, а саме черствіння та пліснявіння. Основна причина псування - розвиток мікроорганізмів [1]. Одним з варіантів запобігання появи і розвитку несприятливої мікрофлори на поверхні хліба є використання біодеградабельної упаковки [2]. При створенні біоплівки важливим є вибір її складу та пробіотичних штамів мікроорганізмів, які будуть входити до неї. На ефективність харчового покриття вливає те, на стільки довго можуть у ній зберігати свою життєздатність бактерії.

У ході роботи досліджували виживання бактерій *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus plantarum*, які мають пробіотичні властивості у біоплівці складу: модифікований картопляний крохмаль, желатин, та як пластифікатор використовували гліцерин (табл. 1).

Таблиця 1 – Виживання *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus plantarum* у біодеградабельному покритті при зберіганні

Мікроорганізми, що використовувались	**Початкова кількість клітин, КУО/см^3**	**Період зберігання, дні**	**Кількість клітин в 1 см^2 біоплівки*, КУО/см^2**
Streptococcus thermophilus	$1{,}9\cdot10^8$	1	$5.8\cdot10^6$
		3	$4\cdot10^6$
		5	$2.8\cdot10^6$
Lactobacillus plantarum	$2{,}5\cdot10^{10}$	1	$5.1\cdot10^6$
		3	$3.7\cdot10^5$
		5	$7\cdot10^4$

Примітка. * стат. рівень значимості $p\leq0.05$, дослід проводили в двох повторностях та вибирали середнє значення.

Отримані нами результати свідчать, що для подальшої розробки пробіотичних плівок для харчових продуктів доцільно використовувати культуру *Streptococcus thermophilus*, адже вона показує хороші показники з життєздатності клітин протягом тривалого періоду зберігання плівки.

Література

1. *Пугаченко О.Б. Особливості хлібопекарного виробництва та їх вплив на склад і облік запасів // Економічні науки – 2009, Вип.15. – С. 310-319.*

2. *Кишеня А.В. Їстівні плівки і покриття, їх роль в якості упаковки // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Ґжицького – 2016, т. 8, № 1. - С. 32 – 38.*