

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет медико-фармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА МЕТАБОЛІТНОГО
ПРОБІОТИКА НА ОСНОВІ БІФІДО- ТА ПРОПОНОВОКИСЛИХ
БАКТЕРІЙ»**

Виконав : здобувачка вищої освіти групи БТ621(3,10д)-02
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія

Анна ПЕТРАШЕНКО

Керівник: Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології,
к.фарм.н, доц. Ольга КАЛЮЖНАЯ

Рецензент: Начальник сектору технологічних досліджень
відділу фармацевтичної розробки ТОВ «БІОЛІК ФАРМА»
к.фарм.н., с.н.с. Лариса СІДЕНКО

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці концепції організації виробництва метабіотика як дієтичної добавки на основі метаболітів *Bifidobacterium longum* та *Propionibacterium shermanii*. Обґрунтовано технологію культивування мікроорганізмів, визначено параметри процесу, розраховано витрати сировини та підібрано обладнання. Розроблено біологічну, технологічну та апаратурну схеми, а також заходи для мінімізації екологічного впливу (переробка біомаси, енергоефективність, очищення стічних вод). Робота забезпечує економічно ефективне та екологічно стале виробництво на ТОВ "БІОЛІК ФАРМА", сприяючи створенню інноваційного продукту з імуномодулюючими та профілактичними властивостями..

Ключові слова: пробіотики, метабіотик, біфідобактерії, пропіоновокислі бактерії, метаболіти, ферментер.

ANNOTATION

The qualification work is devoted to the development of the concept of organizing the production of metabiotics as a dietary supplement based on metabolites of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium shermanii*. The technology of cultivating microorganisms is substantiated, the process parameters are determined, the raw material consumption is calculated and the equipment is selected. The biological, technological and hardware scheme is developed, as well as measures to minimize the environmental impact (biomass processing, energy efficiency, wastewater treatment). The work ensures economically efficient and environmentally sustainable production at BIOLIC PHARMA LLC, contributing to the creation of an innovative product with immunomodulatory and prophylactic properties..

Keywords: probiotics, metabiotics, bifidobacteria, propionic acid bacteria, metabolites, fermenter.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	7
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	25
2.1 Характеристика готового продукту.....	25
2.2 Характеристика сировини.....	29
2.3 Характеристика біологічних об'єктів.....	31
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	40
3 Технологічна частина.....	48
3.1 Розрахунок витрат компонентів.....	48
3.2 Розрахунок і вибір обладнання	49
3.3 Опис технологічного процесу.....	57
3.4 Схеми виробництва.....	63
3.5 Контроль виробництва.....	66
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	68
Висновок.....	73
Список використаної літератури.....	75
Додатки.....	80

					162.02.12.00 000 ПЗ			
Змн..	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Петрашенко				Організація виробництва метаболітного пробіотику на основі біфідо- та пропіоновокислих бактерій Пояснювальна записка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Калужная						2	74
Н. контр.						НФаУ Кафедра біотехнології		
Затвердив	Хохленкова							

ВСТУП

Актуальність теми. Організація виробництва метабіотиків на вітчизняних підприємствах України є актуальною з огляду на сучасні виклики у сфері охорони здоров'я, біотехнологій та економічного розвитку. Метабіотики – це біологічно активні сполуки, отримані з метаболітів пробіотичних мікроорганізмів або їх культуральних рідин, які мають імуномодулювальні, протизапальні та антагоністичні властивості щодо патогенної мікрофлори. Вони є новим поколінням продуктів, що поєднують переваги пробіотиків і постбіотиків, але не потребують живих мікроорганізмів, що спрощує їх зберігання, транспортування та застосування. Актуальність виробництва метабіотиків в Україні обґрунтовується низкою факторів. У світі та в Україні спостерігається зростання інтересу до продуктів, які сприяють підтримці здоров'я, профілактиці захворювань і нормалізації мікробіоти. Згідно з даними міжнародних ринкових досліджень, ринок пробіотиків і постбіотиків, включаючи метабіотики, зростає на 7–10% щорічно. В Україні, де рівень захворювань шлунково-кишкового тракту, дисбактеріозу та імунних розладів залишається високим через стреси, неякісне харчування та широке застосування антибіотиків, метабіотики можуть стати ефективним рішенням. Виробництво таких продуктів на вітчизняних підприємствах дозволить задовольнити внутрішній попит і знизити залежність від імпорту.

Україна має значний науковий потенціал у галузі мікробіології та біотехнологій, зокрема в розробці пробіотичних і метабіотичних продуктів. Інститути НАН України, такі як Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, а також університети й приватні компанії активно досліджують метаболіти пробіотичних штамів, таких як *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* і *Bacillus*. Організація виробництва метабіотиків на вітчизняних підприємствах

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		3

сприятиме комерціалізації наукових розробок, створенню нових робочих місць і підвищенню конкурентоспроможності української біотехнологічної галузі.

В умовах економічної нестабільності та воєнного стану в Україні актуальним є розвиток власного виробництва для зменшення імпортозалежності та підтримки економіки. За даними Міністерства економіки України, у 2024–2025 роках держава впроваджує механізми підтримки національних виробників, включаючи гранти та компенсації за використання вітчизняного обладнання. Виробництво метабіотиків, яке потребує відносно низьких капіталовкладень порівняно з фармацевтичною промисловістю, може стати перспективним напрямом для малих і середніх підприємств. Це також сприятиме підвищенню ВВП і продуктивності праці, що є ключовими цілями інноваційного розвитку.

Метабіотики мають переваги перед традиційними пробіотиками: вони не потребують спеціальних умов зберігання (наприклад, низьких температур), що знижує витрати на логістику, і є стабільними в різних формах (таблетки, порошки, розчини). Організація їх виробництва на вітчизняних підприємствах може використовувати сучасні технології ферментації та екстракції, які є екологічно безпечними та відповідають принципам сталого розвитку. Крім того, метабіотики можуть бути отримані з місцевих штамів мікроорганізмів, що знижує витрати на імпорт сировини.

Воєнний стан в Україні призвів до погіршення психоемоційного стану населення, зростання стресових розладів і порушень мікробіоти через обмежений доступ до якісного харчування та медичних послуг. Метабіотики, які стимулюють імунітет, нормалізують мікрофлору та мають протизапальну дію, можуть стати доступним засобом профілактики та підтримки здоров'я. Виробництво таких продуктів в Україні дозволить знизити їхню собівартість і зробити доступними для широких верств населення.

З підписанням Угоди про асоціацію з ЄС українські підприємства

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		4

отримали доступ до європейського ринку, де попит на біотехнологічні продукти, зокрема метабіотики, стрімко зростає. Організація виробництва метабіотиків на вітчизняних підприємствах може стати основою для експорту, особливо до країн ЄС, де цінуються інноваційні та екологічно безпечні продукти. Це сприятиме зміцненню позицій України на міжнародному ринку та залученню іноземних інвестицій.

За даними 2019 року, лише 13,8% промислових підприємств в Україні здійснювали інноваційну діяльність, з яких 16,8% припадало на сферу виробництва харчових продуктів. Виробництво метабіотиків є інноваційним напрямом, який поєднує біотехнології, фармацевтику та харчову промисловість. Впровадження таких технологій на вітчизняних підприємствах сприятиме підвищенню їхньої конкурентоспроможності, модернізації виробничих потужностей і залученню кваліфікованих кадрів.

Таким чином, організація виробництва метабіотиків на вітчизняних підприємствах є актуальною з огляду на зростаючий попит на функціональні продукти, науковий потенціал України, економічні виклики та можливості експорту. Це сприятиме розвитку біотехнологічної галузі, підтримці здоров'я населення, зниженню імпортозалежності та підвищенню конкурентоспроможності українських підприємств на внутрішньому й міжнародному ринках. Реалізація такого виробництва потребує інвестицій у сучасні технології, підтримки з боку держави та співпраці між науковими установами й бізнесом.

Мета роботи. Метою даної роботи є організація виробництва метабіотика як дієтичної добавки, що включає вибір оптимальної комбінації мікроорганізмів-продуцентів, обґрунтування технології вирощування, технологічних параметрів, оцінку екологічних аспектів виробництва.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Проаналізувати сучасний стан виробництва метабіотиків.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		5

2. Обґрунтувати та охарактеризувати технологічні стадії отримання метабіотика.

3. Розрахувати витрати компонентів на виробництво.

4. Обґрунтувати параметри та вибір обладнання для реалізації процесу.

5. Оформити біологічну, технологічну та апаратурну схеми виробництва згідно із обґрунтованою технологією.

6. На основі аналізу подібних технологій розробити заходи для мінімізації впливу виробництва на навколишнє середовище.

Об'єктом роботи є метабіотик із синергічними властивостями, що обумовлено комплексним складом продуктів життєдіяльності мікроорганізмів *B. longum* та *P. shermanii*.

Предметом роботи є процес організації виробництва метабіотика, а саме технологічні аспекти отримання метабіотика на основі продуктів життєдіяльності мікроорганізмів *B. longum* та *P. shermanii* – первинних та вторинних метаболітів.

Методи. Для вирішення поставлених у роботі завдань використовували аналітичні, креслярські та розрахункові методи.

Практичне значення отриманих результатів. Результати роботи мають практичне значення для створення нового типу пробіотиків із метаболітами, які покращують здоров'я, що може сприяти вітчизняному промисловому виробництву, ринковому успіху та науковим інноваціям. Є потенціал для покращення здоров'я споживачів, зокрема кишкової мікробіоти та імунітету.

Окремі результати роботи представлені на V міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (28 березня 2025 р., м. Харків) та опубліковані в збірці тез (додаток).

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						6
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

Характеристика пробіотиків, наявних на вітчизняному ринку

Пробіотичні мікроорганізми визначаються як живі мікроорганізми, які приносять користь здоров'ю господаря при введенні у достатній кількості [25, 35]. Пробіотики здійснюють корисні функції головним чином через виробництво антимікробних пептидів, засвоєння харчових волокон, регулювання накопичення жиру, модуляцію імунітету слизової оболонки або регулювання мікробіоти кишечника [35]. Протягом століть пробіотики широко використовуються в різних функціональних продуктах харчування, наприклад, йогурт, молоко, сир, дитячі суміші та дієтичні добавки. Найпоширеніші пробіотики містять лакто- та біфідобактерії, які переважно населяють кишечник тварин або людини [31]. Також поширеним є застосування класичних пропіоновокислих бактерій, які відомі своєю здатністю продукувати антибіотичні та біфідогенні, тобто стимулюючі, метаболіти [20, 26].

Останніми роками у вітчизняній практиці пробіотики прийнято класифікувати на 5 поколінь [5, 8, 15, 16, 17]:

До 1 покоління пробіотиків відносять моноштамові препарати, зазвичай містять штами лакто- або біфідобактерій – *Lactobacillus spp.* і *Bifidobacterium spp.*

Пробіотики 2 покоління містять комбінації різних штамів бактерій, тому їх ще називають поліштамовими, також можна зустріти назву симбіотики.

У складі пробіотиків 3 покоління містяться штами, які є активними антагоністами сторонньої мікрофлори, але не є специфічними представниками мікробіому людини та здатні до самоелімінації. Зазвичай містять спорові мікроорганізми, такі як бактерії роду *Bacillus spp.* та дріжджоподібні мікроорганізми, зокрема *Saccharomyces*.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		7

4 покоління пробіотиків представлені комбінованими засобами, що містять певний штам та речовину - пребіотик, що виступає стимулятором росту представників мікробіому людини. Ці комбіновані препарати ще називають синбіотики. Традиційно як пребіотичні компоненти використовують складні вуглеводи, які у ШКТ людини не перетравлюються через відсутність відповідних ферментів у людини, але слугують субстратами для пробіотичних мікроорганізмів. Широко застосування як пребіотичні компоненти набули фруктоолігосахариди, лактулоза, інουλін. Деякі пребіотики можуть випускатися і окремо як препарат або дієтична добавка.

5 покоління пробіотиків не містять живих клітин пробіотичних штамів, містять продукти метаболізму цих мікроорганізмів, тому їх називають метаболітними або метабіотиками.

Розглянемо асортимент та склад пробіотиків різних поколінь, наявних на фармацевтичному ринку, згідно з Державним реєстром лікарських засобів, сервісу Ліки України, Компендіуму та спеціалізованих онлайн-сайтів агрегантів, на яких представлені дієтичні добавки та косметичні засоби. Ринок пробіотичних засобів в Україні досить широкий, але більша частина ринку належать закордонним виробникам. Слід відмітити, що в Україні більшість пробіотиків випускаються як дієтичні добавки, а при реєстрації препарату як лікарського засобу виробник повинен керуватись монографією ДФУ 2.6 «Живі біотерапевтичні лікарські засоби» [2].

Через необхідність збереження стабільності більшість пробіотиків як закордонні, так і вітчизняні виробляють ліофільно висушеними у вигляді порошку для перорального застосування у флаконах, капсулах або саше [3, 6, 15]. Також зустрічаються препарати на основі пробіотиків для місцевого застосування у вигляді супозиторій та м'яких лікарських форм, але ці лікарські форми не випускаються вітчизняною промисловістю, а знаходяться на різних стадіях доклінічних та клінічних досліджень. На пробіотичному ринку наявні і косметичні засоби із пробіотиками у вигляді шампунів, кремів, сироваток

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

тощо.

В Україні ринок виробництва пробіотиків зосереджений переважно у фармацевтичному секторі, де компанії пропонують пробіотичні препарати для нормалізації мікробіоти, переважно у вигляді дієтичних добавок [3, 6]. Однак спеціалізованих виробників, які зосереджені виключно на пробіотиках, небагато, і часто продукція створюється у співпраці з міжнародними партнерами на основі досліджень закордонних компаній. Приклади українських виробників із пробіотичною продукцією, яку вони випускають: Фармак – пробіотики Лактіалє; ТОВ Тернофарм - Флорбілакт Arbor Vitae; Georg BioSystems – Йогурт постантибіотик, Йогурт Comfort, Дісбілак, Ліном; Віво Актив – Біфідумбактерин; Артеріум – Пробіланс; Форсаж Плюс – Пробулар; Елемент Здоров'я – Ентеронорм; Біофарма – Субалін; Фармаком - Пробиотикс 2в1 Нова формула.

На світовому рівні лідерами є компанії з потужною науковою базою та глобальною дистрибуцією, такі як Nestlé, Danone, Yakult та BioGaia, які інвестують у дослідження мікробіому та розробку нових штамів. Найвідоміші світові виробники пробіотиків: Nestlé (Швейцарія) - відома пробіотичними продуктами, такими як йогурти та напої під брендами Nestlé Health Science та Boost. Інвестує у дослідження мікробіому Сайт: www.nestle.com; Danone (Франція) - лідер у виробництві пробіотичних йогуртів (Activia, Danone) з використанням штамів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, Сайт: www.danone.com; Yakult Honsha Co., Ltd. (Японія) - спеціалізується на пробіотичних напоях (Yakult), що містять штам *Lactobacillus casei Shirota*. Має виробничі потужності у 40 країнах. Сайт: www.yakult.co.jp; BioGaia AB (Швеція) - виробляє пробіотичні продукти для дітей, жінок та дорослих, використовуючи штами *Lactobacillus reuteri*. Представлена у 100 країнах Сайт: www.biogaia.com; Protexin (Велика Британія) - відома пробіотичними добавками для людей і тварин (Bio-Kult, Lericol). Заснована у 1992 році, акцентує на наукових дослідженнях. Сайт: www.protexin.com; Arla Foods

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

(Данія) - виробляє пробіотичні молочні продукти, такі як йогурти та кефір, з акцентом на натуральні інгредієнти та стійкість. Сайт: www.arla.com; Kerry Group (Ірландія) - пропонує пробіотичні рішення для харчової промисловості, включаючи штами для функціональних напоїв і добавок. Сайт: www.kerry.com; AB-Biotics (Іспанія) - спеціалізується на унікальних пробіотичних штамах для функціональних продуктів і фармацевтики, підтримує клінічні дослідження. Сайт: www.ab-biotics.com; Probi (Швеція) - виробляє широкий асортимент пробіотичних продуктів, включаючи капсули, порошки та функціональні продукти, з двома виробничими майданчиками в США. Сайт: www.probi.com; Culturelle (США) - відома пробіотичними добавками (Culturelle Digestive Daily Probiotics), що містять штами *Lactobacillus rhamnosus* GG. Найпопулярніший бренд у США за рекомендаціями фармацевтів. Сайт: www.culturelle.com.

Одними з перших вітчизняних **моноштамових пробіотичних препаратів** були Лактобактерин та Біфідумбактерін, які містили, відповідно, штами *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 та / або *L. fermentum* 90T-C4 та *Bifidobacterium bifidum* I та випускались у вигляді ліофілізованої біомаси у флаконах (виробники Біофарма, Біолік) [15].

Представники родин *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* відносяться до типових мікроорганізмів різних епітопів мікробіому людини і вже багато років штами цих бактерій, виділенні з різних джерел, входять до складу пробіотичних лікарських засобів, дієтичних добавок, ферментованих продуктів, наразі набувають популярність і косметичні засоби та продукти з цими пробіотичними мікроорганізмами. Механізм дії лакто- та біфідобактерій заснований на високій колонізаційній здатності до епітелію слизових оболонок мікробіому та відповідно ефективній взаємодії з хазяїном та мікробіомом людини за рахунок: попередження адгезії патогенів до клітин епітелію хазяїна; продукуванню антимікробних агентів, зокрема бактеріоцинів та бактеріоциноподібних сполук; послаблення активації

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

прозапальних факторів транскрипції у відповідь на інфекцію; зниження значення рН за рахунок синтезу органічних кислот, серед яких важлива роль відводиться молочній кислоті як продукту молочнокислого бродіння; модулювання імунної відповіді хазяїна шляхом підвищення рівня інтерлейкінів, імуноглобулінів, регуляторних Т-клітин; виявлення протизапального ефекту [22, 23, 29, 33, 38]. Окремі штами лакто- та біфідобактерій володіють: антивірусною активністю, наприклад за рахунок перешкоджання адсорбції вірусу; протираковою активністю – за рахунок посилення фагоцитозу та проліферації макрофагів, інгібуючого впливу на ракові клітинні лінії; позитивно впливають на зміцнення психологічного здоров'я, наприклад завдяки продукуванню гальмівного нейромедіатора гамма-аміномасляної кислоти та модулюванням цитокінів, пов'язаних зі стресом [27, 35, 38, 42]. Також є відомості про позитивний вплив пробіотичних штамів на зміцнення здоров'я кісток хазяїна, регуляцію рівня холестерину, на перебіг алергічних реакцій [35].

Завдяки різноманітному механізму дії пробіотики цієї групи застосовують для: відновлення нормальної мікрофлори, особливо після лікування антибіотиками, нормалізації роботи ШКТ та поліпшення травлення, виведення токсинів з організму, запобігання транзиторним порушенням роботи кишечника (діарея, запор), зміцнення імунітету та підвищення неспецифічної резистентності до бактеріальних та вірусних інфекцій [15, 19, 34].

Сьогодні, зазвичай комбінують лакто- або біфідобактерії із пребіотичними компонентами у вигляді *синбіотиків* [3, 6, 15]. До пребіотичних компонентів відносяться речовини або комбінація речовин, які вибірково стимулюють ріст та активність мікрофлори. Людина ці компоненти отримує із вуглеводів багатьох фруктів і овочів, а при використанні у складі синбіотиків частіше використовують лактулозу, інулін, фруктоолігосахариди, соєві олігосахариди [5, 28, 43].

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

Як приклади **синбіотиків, що являють собою комбінацію моноштамових пробіотиків та пребіотиків**, на українському ринку присутні: Лактобактерин Ензифарм®, капсули (виробник Ензифарм, України), що містить ліофілізовану мікробну масу пробіотичних лактобактерій, продукти їх метаболізму та пребіотик інулін; Према, порошок у саше (Pharmascience Inc., Канада), у складі якого пробіотичний компонент - *Lactobacillus rhamnosus* GG та пребіотичний - фруктоолігосахариди, мальтодекстрин. До складу багатьох пробіотиків додають і речовини, які позитивно впливають на людину, наприклад, вітаміни або інші активні фармацевтичні інгредієнти. Зокрема, препарат Лактофор (виробник: Ananta Medicare, Індія) окрім пробіотичного штаму *Lactobacillus acidophilus* містить кислоту фолієву та вітамін В12 та речовину симетикон, який використовується для зниження газоутворення у ШКТ [3, 6].

Окрім ліофільно висушених пробіотиків у вигляді порошку у флаконах та саше та у вигляді капсул на ринку можна зустріти рідкі форми, хоча їх значно менше. Таким прикладом є краплі БіоГая Протектіс (виробник Delta Medical Promotions, Швейцарія), які містять життєздатні клітини *Lactobacillus reuteri protectis* [3, 6].

Класичним прикладом одного з перших **поліштамових пробіотиків (симбіотиків)** є Біфікол (виробник ПрАТ «Біофарма»), що містить штами біфідобактерій та кишкової палички (*Bifidobacterium bifidum* I) і живі штами кишкової палички (*Escherichia coli* М 17), які, як і Лактобактерин та Біфідумбактерин, випускались у вигляді ліофілізованої біомаси у флаконах [15]. Наразі на ринку наявна досить велика кількість поліштамових засобів як закордонного, так і вітчизняного виробництва, переважно як дієтичних добавок у вигляді капсул, як найбільш зручної форми для споживачів. Такими прикладами є поліштамові пробіотики сумішей біфідо- та лактобактерій, зокрема: Пробіотикс 2в1 Нова формула (виробник Фармаком, Україна) із вмістом суміші штамів *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium*

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

bifidum; Пробіонекс Йогурт (виробник Форсаж плюс, Україна) - *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* [3, 6].

Окрім класичних лакто- та біфідобактерій до складу поліштамових пробіотиків включають і інші штами, частіше за все стрептококи - *Lactococcus lactis* (молочний стрептокок) і *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (термофільний молочнокислий стрептокок). Молочні стрептококи як і класичні пробіотичні лакто- та біфідобактерії є безпечними для людини та застосовуються при виробництві багатьох ферментованих продуктів харчування [31, 32, 44]. Подібні комбінації значно розширюють спектр дії та активності пробіотичного засобу завдяки здатності лактококів та термофільних стрептококів виробляти бактеріоцини, мікробні полісахариди з вираженими імуностимулюючими властивостями, антиоксидантні речовини, виявленню протизапальних властивостей [13, 15, 28].

Завдяки цьому, такі симбіотики застосовують: при лікуванні інфекційних захворювань, в тому числі, що викликані лістеріями, туберкульозною паличкою, патогенними стафілококами, збудниками ботулізму тощо; для профілактики і лікування запальних захворювань кишечника, зокрема хвороби Крона та неспецифічного виразкового коліта; у профілактиці антибіотико-асоційованої діареї [3, 15, 35].

Так, у складі Пробімакс Форте (виробник Ілан Фарм, Україна) міститься комплекс наступних штамів *Lactobacillus helveticus* R0052, *L. rhamnosus* HA-111, *Bifidobacterium lactis* B94, *B. longum* HA-135, *L. casei* HA-108, *L. plantarum* R1012, *B. breve* HA-129, *B. bifidum* HA-132, *Streptococcus thermophilus* HA-110; у складі пробіотика Йогурт в капсулах (виробник Pharmascience Inc., Канада) - *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*; Йогурт Lacto Smart (виробник Євро Плюс, Україна) містить *Lactobacillus rhamnosus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*; Лінорм Екстра (виробник: Георг Біосистем, Україна) із сумішшю *Lactobacillus rhamnosus*, *L.*

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

acidophilus, *L.delbruesckii*, *Streptococcus thermophilus* [3, 6].

Поліштамові пробіотики, як і моноштамові, також часто комбінують із пребіотичними компонентами та випускають у вигляді **синбіотичних поліштамових пробіотиків**. Відомим прикладом такого комбінованого препарату є Лінекс форте (виробник ФК Лек, Словенія) – містить 2 штами *Lactobacillus acidophilus* та *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* у комбінації із пребіотичними компонентами - мальтодекстрином та комплексом Beneo® Synergy 1 (інулін, олігофруктоза (глюкоза + фруктоза + сахароза). До синбіотичних поліштамових пробіотиків відноситься: Бревелак (виробник: World Medicine, Румунія) у капсулах, що містить 4 штами лактобацил - *Lactobacillus helveticus* R0052, *L. rhamnosus* R0011, *L. casei* R0215, *L. plantarum* R1012, 3 штами біфідобактерій - *Bifidobacterium longum* R0175, *B. breve* R0070, *B. bifidum* R0071, штами стрепто- та лактококів - *Streptococcus thermophilus* R0083, *Lactococcus lactis ssp. lactis* R1058 у комбінації із вітамінами С та групи В (В1, В2, В6) [3, 6].

До вітчизняних синбіотичних поліштамових препаратів відносяться: Лінорм (виробник Георг Біосистем, Україна), що містить суміш штамів *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium bifidum* та пребіотик - рослинну клітковину; Лактіале (виробник Фармак, Україна), що містить 7 пробіотичних штамів *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum* та фруктоолігосахаріди; Пробам Лакто Ваум Pharm (виробник Баум Фарм Гмбх, Україна), містить суміш *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* та альтодекстрину [3, 6].

Широко відомими поліштамовими пробіотиками на українському ринку є мультипробіотики компанії «О.Д. Пролісок» (сайт: <https://symbiter.ua/uk/>), яка випускає широку лінійку пробіотиків. Мультипробіотики Симбітер містять комбінацію 14 штамів пробіотичних бактерій та залежно від призначення певні корисні речовини: Симбітер ацидофільний, Симбітер

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

ацидофільний у флаконах, Симбітер ацидофільний концентрований, Симбітер-М дитячий (для дітей з народження), Симбітер-М концентрований (для дітей та дорослих), Симбітер-2 (для жінок, у т.ч. вагітних, породіль та годуючих), Симбітер форте-Д (для дітей), Симбітер форте-М, Сибітер форте злаковий, Симбітер форте-омега, Симбітер форте з прополісом (для дітей від 3 років та дорослих). Мультипробіотик Апібакт цієї ж компанії містить 15 пробіотичних штамів та екстракт прополісу (1,5 та 2,5 %). Окрім цього компанія випускає функціональне харчування на основі власних комбінацій заквасок – Симбівіт.

До складу мультипробіотиків Симбітер та Апібакт окрім лакто- та біфідобактерій, входять також пропіоновокислі та оцтовокислі бактерії. До складу пробіотиків включають класичні пропіоновокислі бактерії видів *Propionibacterium freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. jensenii*. Корисні властивості пропіоновокислих бактерій зв'язані із синтезом великої кількості метаболітів, які позитивно впливають на організм хазяїна: пропіонової, оцтової, бурштинової, мурашиної, молочної кислот, вітамінів, особливо вітамінів групи В, амінокислот, полісахаридів, ферментів, антиоксидантних, імуномодуючих речовин тощо [30, 37]. Так, пропіонова кислота – основний продукт метаболізму бактерій - пригнічує патогенні мікроорганізми, нормалізує рівень холестерину в крові, приймає участь у вуглеводному обміні тощо, також важливим є синтез протианемічного вітаміну В12, який синтезується в організмі виключно за рахунок мікроорганізмів [37]. Оцтовокислі бактерії родини *Acetobacter* відносяться до активних стимуляторів росту та фізіолого-біохімічних властивостей пробіотичних сахаролітичних анаеробів родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* [13].

До подібних мультипробіотиків можна віднести і пробіотик Флорбілакт Arbor Vitae (виробник ТОВ Тернофарм, Україна), що містить комбінацію цинку та комплексу 15 штамів бактерій: *Bifidobacterium breve* BB-G95, *B.*

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

bifidum BB-G90, *B. animalis ssp lactis* BL-G101, *B. longum ssp longum* BL-G301, *B. longum ssp infantis* BI-G201, *Lactobacillus acidophilus* LA-G80, *L. plantarum* Lp-G18, *L. rhamnosus* Lr-G14, *L. delbrueckii ssp bulgaricus* LB-G40, *L. casei* LC-G11, *L. paracasei* LPc-G110, *L. reuteri* LR-G100, *L. salivarius* LS-G60, *L. helveticus* LH-G51, *L. gasseri* LG-G12 [3, 6].

Хоча виробниками надається перевага випуску пробіотиків у капсулах, можна зустріти і таблетовані форми, наприклад, Зафакол IQ (виробник Альпіфлор, Італія) – кишковорозчинні таблетки вкриті оболонкою. Цей препарат як діючі речовини, окрім пробіотичних компонентів – штамів *Lactobacillus helveticus* LH060-LMG-P31392, *Bifidobacterium Synbalance* BI072 - DSM 26197, містяться пребіотики - холекальциферол, бутират кальцію (джерело масляної кислоти), фруктоолігосахарид, останній також виконує роль наповнювача разом з мікрокристалічною целюлозою, як антиковзуючий агент добавка містить магнію стеарат, а плівкоутворювач складається з Aquapolish FWhite 110, 12E, кальцію карбонату, сорбітолу, тальку, натрію альгінату, натрію карбоксиметилцелюлози, гліцеролу [3, 6].

Основною особливістю **пробіотиків 3 покоління** є їхня здатність до самоелімінації з організму після виконання терапевтичної функції, що знижує ризик тривалої колонізації та дисбалансу мікробіоти. До складу таких пробіотиків зазвичай входять спороутворювальні бактерії роду *Bacillus* (наприклад, *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*) та дріжджоподібні гриби, зокрема *Saccharomyces* (*Saccharomyces boulardii*) [15].

На відміну від пробіотиків 1 покоління (містять поодинокі штами, наприклад, *Lactobacillus* або *Bifidobacterium*) та 2 покоління (комбінації кількох штамів), пробіотики 3 покоління мають ширший спектр антагоністичної дії та стійкість до несприятливих умов (кислого середовища шлунка, антибіотиків), що забезпечується їхньою споровою формою або міцною клітинною структурою [15].

Пробіотики 3 покоління діють через комплексний механізм,

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

спрямований на пригнічення патогенної мікрофлори, відновлення балансу мікробіоти та модуляцію імунної відповіді. Основні аспекти їхньої дії включають [9, 15, 28]:

1. Антагоністична активність:

Bacillus spp. синтезують бактеріоцини (субтилін, коагулін), антимікробні пептиди та органічні кислоти, які пригнічують ріст патогенів (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*). Спори дозволяють бактеріям виживати в шлунку та активізуватися в кишечнику.

Saccharomyces boulardii конкурує з патогенами за адгезію до слизової оболонки кишечника, синтезує протеази, які розщеплюють токсини (*C. difficile* токсин А і В), та знижує рН середовища.

2. Секреція біоактивних сполук:

Bacillus spp. продукують ферменти (амілази, протеази, ліпази), які покращують травлення та засвоєння поживних речовин. Вони також синтезують антиоксиданти, що зменшують оксидативний стрес.

Saccharomyces boulardii секретує поліаміни та глюкани, які зміцнюють бар'єрну функцію кишечника та стимулюють регенерацію епітелію.

3. Імуномодуляція:

Bacillus spp. стимулюють продукцію протизапальних цитокінів (IL-10) і активують дендритні клітини, посилюючи місцевий імунітет.

Saccharomyces boulardii підвищує секрецію IgA в кишечнику, що сприяє захисту від патогенів, і пригнічує прозапальні цитокіни (TNF- α).

4. Самоелімінація:

Обидва типи мікроорганізмів не формують постійних колоній у кишечнику людини. *Bacillus* у вегетативній формі виводяться з фекаліями протягом 1–2 тижнів після припинення прийому. *Saccharomyces boulardii* елімінується через 3–5 днів, що запобігає дисбалансу мікробіоти.

5. Покращення бар'єрної функції кишечника:

Bacillus і *Saccharomyces* стимулюють синтез муцину, який захищає

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

слизову оболонку від патогенів і токсинів.

Saccharomyces boulardii також знижує проникність кишечника, запобігаючи синдрому «дірявого кишечника».

6. Антитоксична дія:

Saccharomyces boulardii нейтралізує бактеріальні токсини шляхом прямого зв'язування або ферментативної деградації.

Bacillus зменшує генотоксичність шляхом адсорбції шкідливих метаболітів.

Серед пробіотиків, що містять штами неспецифічної мікрофлори – спороутворюючі та самоелімінуючі відомими є: Ентерожерміна форте (виробник Opella Healthcare, Італія) у вигляді оральної суспензії, що містить спори полірезистентного штаму *Bacillus clausii*; Ентерол 250 (виробник Biocodex, Франція) у вигляді порошку у саше із вмістом *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745; Нормагут (виробник: Mega Lifesciences Company Ltd, Таїланд) у капсулах з основою – штамом *Saccharomyces boulardii*. Серед вітчизняних пробіотиків цієї групи препарат Лактіале Жерміна (виробник Фармак, Україна), що випускається у вигляді суспензії у флаконах та містить спори *Bacillus clausii* UBBC. Цікавий штам міститься у складі пробіотика Лактовіт форте - *Bacillus coagulans*, який відноситься до спороутворюючої бактерії, що продукує молочну кислоту, синтезує та виділяє спермідин у позаклітинний простір. Речовина спермідин привертає увагу розробників пробіотиків через її вплив на продовження здорового довголіття. З віком здатність людей синтезувати путресцин, попередник спермідину, знижується, і необхідне його доповнення з раціону або від представників мікробіому людини. *B. coagulans* синтезує спермідин з аргініну через агматин, путресцин і карбокиспермідин у послідовних реакціях. Окрім синтезу спермідину та продукції молочної кислоти *B. coagulans* стійка до шлункової кислоти та відома своїми корисними властивостями як пробіотик [3, 6].

На ринку можна зустріти і різноманітні комбінації штамів, що не є

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

класичними представниками мікрофлори людини, але володіють потужними корисними властивостями для людини. Наприклад, пробіотик Максібаланс (виробник Алліанз Біосайнсіз, Індія) у капсулах містить штами термофільних стрептококів *Streptococcus faecalis* T-110, спороутворюючих клостридій *Clostridium butyricum* TO-A, бацилюс *Bacillus mesentericus* та спороутворюючих лактобактерій *Lactobacillus sporogenes* [3, 6].

Для розширення спектра дії пробіотичні **штами** цієї групи **самоелімінуючих бактерій також комбінують із класичними лакто- та біфідобактеріями та пребіотичними компонентами**. Так, на ринку наявні наступні препарати: Неофлорум (виробник Lallemand Health Solutions, Канада) у вигляді капсул із комбінацією пробіотичних бактерій - *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus helveticus*, *L. rhamnosus*, та дріжджів - *Saccharomyces boulardii*; Лацидоентер (виробник: Фармюніон БСВ Девелопмент, Україна) у капсулах із комбінацією *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus plantarum* та цинком; Лактімак Форте (виробник Macleods Pharmaceuticals, Індія) у вигляді капсул з відстроченим вивільненням із широким спектром пробіотичних мікроорганізмів, як тих, що самоелімінуються, дріжджових та спорових - *Saccharomyces boulardii*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus clausii*, так і класичних представників мікрофлори - *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis*, *B. longum*; також пребіотик фруктоолігосахариди; Пробіс, капсули (виробник Unic Biotech Ltd, Індія), що містить комбінацію лакто- та біфідобактерій - *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum* та дріжджові клітини - *Saccharomyces boulardii*; Актив Флора Дуо (Alpen Pharma, Швейцарія), капсули із комбінацією дріжджів *Saccharomyces boulardii* DBVPG 6763, лактобактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 та пребіотика інуліну; Опефера (виробник: World Medicine, Румунія) у капсулах із комбінацією класичних пробіотичних бактерій – лактобацил *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* та біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum*,

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

B. longum, *B. infantis*, термофільних стрептококів - *Streptococcus thermophilus*, дріжджів - *Saccharomyces boulardii* та сухого екстракту квіток ромашки аптечної [3, 6].

Окремою групою серед пробіотиків є **метабіотики**, які являють собою структурні компоненти пробіотичних бактерій, їх метаболіти або сигнальні молекули з відомою хімічною структурою, які чинять позитивний вплив на мікробіоту та здоров'я людини. На відміну від традиційних пробіотиків, які містять живі мікроорганізми, метабіотики є продуктами життєдіяльності цих мікроорганізмів або їх фрагментами, що забезпечують терапевтичний ефект без необхідності введення живих клітин. Вони включають коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), пептиди, полісахариди, ферменти, вітаміни та інші низькомолекулярні біологічно активні речовини (НБАР) [19].

Метабіотики не містять живих клітин, що робить їх більш стабільними та безпечними для використання. Вони діють через специфічні біохімічні механізми, наприклад, шляхом модуляції імунної відповіді або стимуляції росту корисних бактерій.

У закордонній літературі можна зустріти термін «постбіотики», який є більш ширшим та охоплює метаболіти та фрагменти клітин пробіотичних бактерій після їх лізису. Постбіотики включають метабіотики, але також можуть містити клітинні стінки, ДНК або інші неактивні компоненти. Таким чином, метабіотики є підгрупою постбіотиків, але з акцентом на чітко визначені активні молекули [28, 35].

Основна відмінність метабіотиків полягає в їх стабільності, тривалому терміні зберігання та меншій взаємодії з компонентами харчових продуктів, що підтверджується дослідження [1].

Можна виділити наступні напрямки дії метабіотиків через кілька механізмів, які сприяють підтримці здоров'я ШКТ та загального стану організму:

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						20
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1. Антагоністична активність: Метаболіти, такі як органічні кислоти (оцтова, пропіонова), знижують рН середовища, створюючи несприятливі умови для патогенних бактерій, наприклад, *Bacillus cereus* або *Staphylococcus aureus* [45].

Антибактеріальна активність органічних кислот зумовлена їх пасивною дифузією через мембрану в клітину, що призводить до зниження внутрішньоклітинного рН. Підкислення цитозолу значно знижує активність ферментів, є генотоксичним та викликає денатурацію білків, що призводить до загибелі клітин [42]. Окрім органічних кислот важливими метаболітами пробіотичних бактерій із антагоністичною активністю є: етанол, ферменти, діацетил, екзополісахариди (EPS, ЕПС), вуглекислий газ та перекис водню [32, 44].

Молочна кислота – це поширений хімічний консервант, який пригнічує ріст як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій. Бактеріостатичні властивості молочної кислоти присутні навіть у концентраціях 1–2% та при рН > 5. У списку харчових добавок/консервантів Європейського агентства з безпеки харчових продуктів (EFSA) молочна кислота має номер E270 [21].

Оцтова кислота використовується як консервант у різноманітних харчових продуктах. Оцтова кислота ефективно пригнічує ріст та знижує життєздатність грампозитивних та грамнегативних бактерій, а також дріжджів та цвілі. Бактерицидна активність проявляється при концентраціях > 0,3 %, тоді як бактеріостатична може проявлятися при концентраціях 0,2 %. У списку харчових добавок/консервантів EFSA оцтова кислота має номер E260 [21].

Пропіонова кислота є відносно сильною кислотою. Невеликі кількості (0,1–0,2 %) пригнічують ріст патогенних бактерій, грибків, цвілі та дріжджів. Пропіонова кислота зменшує наявність патогенних мікроорганізмів у молочних та зернових продуктах, безалкогольних або слабоалкогольних напоях, а також деяких свіжих фруктах та овочах. Додана до кормів для птиці, вона зменшує забруднення *Salmonella spp.* та утворення цвілі. У списку

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

харчових добавок/консервантів EFSA пропіонова кислота має номер E280 [21].

Діацетил ефективно пригнічує грамнегативні бактерії, дріжджі та, у вищих концентраціях, грампозитивні бактерії. Протягом багатьох років він був відомий як ароматизатор зі статусом GRAS (загальновизнаний як безпечний). Діацетил нетоксичний; однак слід зазначити, що леткий діацетил при вдиханні людиною може бути токсичним [40].

Перекис водню є побічним продуктом деяких анаеробних штамів молочнокислих бактерій. Антимікробний токсичний вплив на бактерії, цвіль та віруси здійснюється через перекиси та вільні радикали, які називаються активними формами кисню, що містять принаймні один атом кисню та один або більше неспарених електронів [27].

Вуглекислий газ, що виробляється при бродінні певними групами пробіотичних бактерій, пригнічує ріст грампозитивних та грамнегативних бактерій, включаючи *Enterobacteriaceae* та *Listeria monocytogenes*. У списку харчових добавок/консервантів EFSA вуглекислий газ має номер E290 [21].

Екзополісахариди (EPS) – це високомолекулярні біополімери, синтезовані пробіотичними мікроорганізмами. Вони класифікуються на дві групи: гомополісахариди (HoPS) та гетерополісахариди (HePS). Пробіотичні мікроорганізми виробляють переважно HePS [39]. EPS використовуються в харчовій промисловості як емульгатори, стабілізатори, загусники та гелеутворювачі. Деякі EPS продемонстрували антибактеріальну активність проти *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* та *Bacillus cereus* [22, 29, 38].

2. Стимуляція росту корисної мікробіоти: Наприклад, DHNA – (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid) 1,4-гідроксі-2- нафтоїнова кислота, синтезована пропіоновокислими бактеріями (*Propionibacterium shermanii*), стимулює ріст біфідобактерій шляхом відновлення NAD⁺, що сприяє їх метаболічній

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

активності, тому цю речовину відносять до біфідогенних стимуляторів [36].

3. Імуномодуляція: Метабіотики, такі як SCFA, КЛЖК – (short chain fatty acids) коротколанцюгові жирні кислоти, наприклад бутират, пропіонат, впливають на імунну систему, стимулюючи продукцію протизапальних цитокінів і пригнічуючи прозапальні реакції [41].

4. Антиоксидантна дія: Деякі метабіотики, наприклад, фермент каталаза, синтезований *Propionibacterium*, нейтралізують вільні радикали, зменшуючи оксидативний стрес [43].

5. Зниження генотоксичності: Пропіоновокислі бактерії здатні нейтралізувати генотоксичну дію хімічних сполук і УФ-променів, що сприяє захисту клітин господаря [37].

Використання метабіотиків має свої переваги: безпека - відсутність живих мікроорганізмів знижує ризик інфекцій, особливо для імунокомпрометованих осіб; стабільність - метабіотики мають тривалий термін зберігання завдяки стійкості до зовнішніх факторів (температура, pH); мінімальна взаємодія з продуктами - на відміну від пробіотиків, метабіотики не вступають у небажані реакції з компонентами їжі; широкий спектр дії - впливають на мікробіоту, імунну систему, обмін речовин і захист від патогенів; простота виробництва - можливість використання супернатантів культуральних рідин знижує витрати на отримання живих культур [5, 19].

Серед недоліків метабіотиків можна виділити: обмежена колонізація - на відміну від пробіотиків, метабіотики не здатні колонізувати кишечник, що може обмежувати тривалість їх дії; недостатні вивчення - дослідження метабіотиків перебувають на ранніх етапах, і потрібні додаткові клінічні випробування для підтвердження ефективності; складність стандартизації - визначення точного складу активних компонентів у супернатантах може бути технічно складним [5, 19].

Із комерційних препаратів метабіотиків на вітчизняному ринку наявний

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						23
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

препарат Хілак форте (виробник: Меркле ГмбХ, Німеччина) у вигляді оральних крапель. До складу препарату входять метаболіти *Escherichia coli* DSM 4087, *Enterococcus faecalis* DSM 4086, *Lactobacillus acidophilus* DSM 4149 *Lactobacillus helveticus* DSM 4183. В Україні метаболітними пробіотиками займається Л.В. Капрельянц та його учні і на сьогоднішній день розроблено препарати БПМ - функціональний харчовий інгредієнт на основі метаболітів консорціуму *Bifidobacterium longum*-ЯЗ та *Propionibacterium shermanii*-4, характеризується пробіотичними та антагоністичними властивостями, та Бігістім - препарат на основі культуральної рідини *P. shermanii*-4, що містить DHNA, з вираженим біфідогенним ефектом [3, 6].

Зважаючи на відсутність українських метабіотиків та їхні потенційні переваги як групи продуктів, корисних для здоров'я людини, організація виробництва метабіотиків на вітчизняних підприємствах є актуальною.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Готовий продукт – дієтична добавка – метабіотик, яка містить суміш первинних та вторинних метаболітів біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій, у вигляді ліофілізованого порошку розфасованого по 0,5 г у флаконах.

Нормативне регулювання у сфері виробництва, обігу та маркування дієтичних добавок здійснюється згідно із Законом України № 4122-ІХ від 05.12.2024 "Про внесення змін до деяких законів України щодо удосконалення регулювання виробництва та обігу дієтичних добавок, врегулювання інших питань у сфері охорони здоров'я", уточнено термінологію, зокрема визначення дієтичних добавок як харчових продуктів, що доповнюють раціон і містять речовини з фізіологічним ефектом, а також встановлено, що дієтичні добавки не є лікарськими засобами, і їхнє використання не може претендувати на терапевтичний ефект. Відповідно до внесених змін при характеристиці дієтичних добавок не можна оперувати поняттям терапевтичний ефект, а для опису позитивної дії запропонованого метабіотика охарактеризуємо первинні та вторинні метаболітів, що містяться у культуральних рідинах обраних видів бактерій (шляхи утворення первинних та вторинних метаболітів у цих видах бактерій описано у підрозділі 2.4), на основі чого визначимо фізіологічний ефект метабіотик. Після проведення додаткових досліджень, зокрема щодо ідентифікації та кількісного визначення ключових метаболітів метабіотика, а також доклінічних та клінічних досліджень, у перспективі підприємство може зареєструвати продукт як лікарський засіб, тому деякі показники дієтичної добавки пропонуємо визначати за вимогами ДФУ.

Характеристика первинних та вторинних метаболітів:

До первинних метаболітів відносяться сполуки, які необхідні для росту та виживання бактерій, продукуються під час основного обміну речовин, а вторинні метаболіти продукуються не для основного росту, а для адаптації до умов середовища чи конкуренції [7, 9].

Характеристика первинних та вторинних метаболітів біфідобактерій (*Bifidobacterium spp.*) [7, 9, 18, 23, 24, 41, 45]:

1. Коротколанцюгові жирні кислоти (SCFA) – оцтова кислота (ацетат), молочна кислота (лактат),

- Оцтова кислота - забезпечує енергію для клітин товстої кишки (колонокитів), підтримує бар'єрну функцію слизової оболонки, має протизапальну дію;

- Молочна кислота - знижує рН кишківника, пригнічуючи ріст патогенів (наприклад, *Salmonella*, *Clostridium*), є субстратом для інших корисних бактерій, таких як пропіоновокислі.

2. Екзополісахариди (EPS) - сприяють адгезії біфідобактерій до слизової оболонки кишківника, захищають її від пошкоджень, мають імуномодулюючу дію.

3. Вітаміни (групи В, зокрема фолати) - фолати (вітамін В9) необхідні для синтезу ДНК, профілактики анемії та підтримки метаболізму;

4. Вторинні метаболіти - кон'югована лінолева кислота, вітаміни, бактеріоцини:

- Кон'югована лінолева кислота (CLA) - має протизапальні та антиканцерогенні властивості, сприяє зниженню ваги, підтримує здоров'я серцево-судинної системи;

- Бактеріоцини - пригнічують ріст патогенних бактерій, таких як *Listeria* чи *Escherichia coli*, сприяючи балансу мікробіоти.

Характеристика первинних та вторинних метаболітів пропіоновокислих бактерій (*Propionibacterium freudenreichii* та інші) [9, 13, 15, 20, 37, 43]:

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

1. Первинні метаболіти – пропіонова та оцтова кислоти:

- Пропіонова кислота - забезпечує енергію для клітин кишківника, має протизапальну дію, пригнічує ріст патогенів, може знижувати рівень холестерину в крові шляхом впливу на метаболізм печінки;

- Оцтова кислота - аналогічно до біфідобактерій, підтримує енергетичний обмін у клітинах кишківника, має протизапальний ефект.

2. Вітамін B12 (кобаламін) - необхідний для синтезу еритроцитів, роботи нервової системи, профілактики анемії. Особливо корисний для веганів, у яких часто виникає дефіцит B12.

3. Вторинні метаболіти:

- 1,4-Дигідроксі-2-нафтоїнова кислота (DHNA) - стимулює ріст біфідобактерій, має протизапальні та антиоксидантні властивості, підтримує здоров'я слизової оболонки кишківника;

- Бактеріоцини (наприклад, пропіоцини) - пригнічують ріст патогенних бактерій (*Staphylococcus*, *Clostridium*), сприяючи балансу мікробіоти;

- Трегалоза - діє як пребіотик, захищає клітини від стресу (наприклад, від зневоднення), підтримує стабільність мікробіоти.

Як один із важливих компонентів метабіотики зупинимось на позитивних властивостях DHNA детальніше [5, 36]:

1. Стимуляція росту біфідобактерій мікробіому - DHNA активує ріст і метаболічну активність біфідобактерій (*Bifidobacterium spp.*) у кишківнику шляхом взаємодії з їхніми рецепторами або шляхом модуляції кишкового середовища.

2. Модуляція імунітету - має протизапальні властивості, сприяючи балансу імунної відповіді та знижуючи продукування прозапальних цитокінів.

3. Антиоксидантна дія - захищає клітини кишківника від окисного стресу, що може підтримувати здоров'я слизової оболонки.

Фізіологічні ефекти метабіотики:

На основі властивостей цих речовин можна визначити фізіологічні

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

ефекти метабіотика, що містить ці метаболіти. Таким чином, метабіотик, який включає метаболіти біфідобактерій і пропіоновокислих бактерій, має комплексну дію:

1. Підтримка мікробіоти: SCFA (оцтова, молочна, пропіонова кислоти) та DHNA стимулюють ріст корисних бактерій, зокрема біфідобактерій, пригнічуючи патогени.

2. Покращення здоров'я кишківника: SCFA та DHNA забезпечують енергію для клітин кишківника, знижують запалення, підтримують бар'єрну функцію слизової.

3. Імуномодуляція: Бактеріоцини, CLA та DHNA зменшують запальні процеси, зміцнюють імунну систему.

4. Метаболічні переваги: Вітаміни B12 і фолати підтримують обмін речовин, а пропіонова кислота може позитивно впливати на рівень холестерину.

5. Антиоксидантний захист: DHNA та трегалоза захищають клітини від окисного стресу, що корисно для профілактики хронічних захворювань.

Метаболіти біфідобактерій (SCFA, CLA, фолати, бактеріоцини) і пропіоновокислих бактерій (пропіонова кислота, DHNA, вітамін B12, бактеріоцини) у складі метабіотика забезпечують синергетичний ефект, підтримуючи здоров'я кишківника, імунітет і загальний метаболізм. Такий метабіотик може бути особливо корисним для профілактики дисбіозу, запальних захворювань кишківника та дефіциту вітамінів.

Пакування:

у флаконах по 5 мл із $0,5 \text{ г} \pm 1 \%$ порошку, по 10 флаконів в упаковці.

Органолептичні властивості:

Кристалічний порошок, світло-коричневого кольору, із специфічним солодкуватим смаком, без запаху.

Фізико-хімічні властивості:

Легко розчинний у воді, масова частка вологи не більше 3,5 %, рН 5,5-

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

6,5.

Склад дієтичної добавки:

Продукти життєдіяльності *B. longum* та *P. shermanii*, залишки живильних середовищ та захисного середовища невизначеного складу.

Мікробіологічна чистота:

Повинна відповідати критеріям прийнятності для неводних препаратів для орального застосування статті 5.1.4 ДФУ 2.6: загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) повинно бути не більше 10^3 КУО/г або КУО/мл, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – не більше 10^2 КУО/г або КУО/мл; у 1 г або 1 мл повинні бути відсутні *Escherichia coli*.

Застосування:

Продукт не можна вживати у чистому вигляді через кислий рН, обумовлений утворенням органічними кислотами. Тому порошок з флакону розчиняють у воді або інших рідинах (чай, фруктовий сік), не слід розчиняти у молоці через можливість зсідання.

Застереження:

Через кислий рН людям із гастритом слід проконсультуватись із лікарем.

Термін придатності та умови зберігання:

12 міс., у сухому місці при температурі 5 ± 1 °С.

2.2 Характеристика сировини

Для сумісного вирощування біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій пропонуємо використовувати середовище із додаванням соєвої сироватки, яку останнім часом дослідники рекомендують використовувати для сумісного культивування пробіотичних культур, сирну сироватку, пептон та мінеральні солі [1, 5, 43]. Продукти з сої привертають велику увагу не лише як джерела важливих поживних речовин, а й як активні носії пробіотичних мікроорганізмів, пребіотиків і синбіотиків. Ферментація соєвих екстрактів (соєвого молока) корисними мікроорганізмами дозволяє не лише підвищити їх

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

харчову цінність, а й збагатити біологічно активними сполуками. Для приготування захисного середовища при висушуванні використовують молоко знежирене, желатоза, сахароза. Характеристика основної сировини наведена у табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Характеристика сировини

Найменування	Категорія і номер НТД	Показники перевірки	Примітка
соєва сироватка	НТД від постачальника	Органолептичні та санітарно-епідеміологічні показники	приготування ферментаційного середовища
агар-агар	ГОСТ 17206-84	Органолептичні показники, кислотність, сертифікат від постачальника	приготування ферментаційного середовища
сирна сироватка	НТД від постачальника	Органолептичні та санітарно-епідеміологічні показники	приготування ферментаційного середовища
пептон ферментативний ХЧ	ГОСТ 13805-76	Органолептичні показники, вміст основної речовини, граничний вміст домішок, сертифікат від постачальника	приготування ферментаційного середовища
калій фосфорнокислий однозаміщений ХЧ	ГОСТ 4147-74	вміст основної речовини, граничний вміст домішок, маркування, сертифікат від постачальника	приготування ферментаційного середовища
магній сірчанокислий ХЧ	ГОСТ 4233-77	вміст основної речовини, граничний вміст домішок, маркування, сертифікат від постачальника	приготування ферментаційного середовища
натрій лимоннокислий трізаміщений ХЧ	ГОСТ 3652-69	вміст основної речовини, граничний вміст домішок, розчинність, рН, маркування, сертифікат від постачальника	приготування ферментаційного середовища
аскорбінова кислота ХЧ	ГОСТ 4815-	Органолептичні	приготування

	76	показники, вміст основної речовини, граничний вміст домішок, розчинність, маркування, сертифікат від постачальника	ферментаційного середовища
молоко знежирене	ДСТУ ISO 7208:2002	Органолептичні показники, жирність, маркування, сертифікат від постачальника	приготування захисного середовища
желатоза	ГОСТ 11293-89	Органолептичні показники, домішки, вологість, сертифікат постачальника	приготування захисного середовища
сахароза	ДСТУ 4623:2023	Органолептичні показники, молекулярна маса, маркування, сертифікат від постачальника	приготування захисного середовища
вода дистильована	ДФУ 2.6	Органолептичні показники, питома електропровідність, бактеріальні ендотоксини, мікробна чистота	приготування середовищ

2.3 Характеристика біологічного об'єкту

Основою створення метаболітного пробіотику є широко відомі своїм позитивним впливом на організм людини види пробіотичних бактерій *Bifidobacterium longum* та *Propionibacterium shermanii*. За приклад взята комбінація штамів *B. longum* – Я 3 та *P. shermanii* – 4, досліджена українськими вченими, зокрема д. техн. н., проф. Капрельянц Л.В. та його учнями [1, 5, 43].

2.3.1 Характеристика біфідобактерій

Систематичне положення, еволюційні аспекти розвитку. Біфідобактерії належать до роду *Bifidobacterium*, класу *Actinobacteria*, порядку *Bifidobacteriales*, родини *Bifidobacteriaceae*. На сьогодні відомо понад 80 видів

біфідобактерій, серед яких найпоширенішими є *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. adolescentis* та *B. animalis subsp. lactis*. Ці мікроорганізми є важливими представниками нормальної мікробіоти кишечника людини та тварин [15].

Еволюційно біфідобактерії походять від актинобактерій, які адаптувалися до анаеробних умов травного тракту. Їх еволюція пов'язана з розвитком здатності ферментувати складні вуглеводи, зокрема олігосахариди, що містяться в грудному молоці та рослинній їжі. Геномний аналіз показує, що біфідобактерії втратили деякі гени, пов'язані з патогенністю, натомість розвинули гени, які кодують ферменти для метаболізму пребіотиків (наприклад, фруктоолігосахаридів). Ця спеціалізація дозволила їм зайняти нішу в кишечнику ссавців, де вони відіграють роль комменсалів [9, 13, 24].

Цитологічні особливості. Біфідобактерії є грампозитивними бактеріями з високим вмістом Г+Ц у ДНК (55–67 %). Їх клітинна стінка містить пептидоглікан типу А4 β , з міжпептидними містками, що включають L-орнітин або L-лізин. Стінка також містить полісахариди та тейхоеві кислоти, які сприяють адгезії до слизової оболонки кишечника та імуномодуляції [24].

Цитоплазма біфідобактерій містить нуклеоїд із кільцевою ДНК, рибосоми та, в деяких випадках, плазмід, які кодують стійкість до стресових умов або метаболічні функції. Біфідобактерії не утворюють спор, але можуть переходити в стан зниженої метаболічної активності (анабіоз) за несприятливих умов. Унікальною особливістю є наявність ферментативних систем, таких як β -галактозидаза та фруктозо-6-фосфат-фосфокетолаза, які беруть участь у біфідному шляху ферментації [7, 9].

Мікроскопічні характеристики. Біфідобактерії мають характерну Y- або V-подібну форму, що нагадує розгалужені палички (звідси назва «bifidus» – роздвоєний). Розміри клітин варіюють від 0,5–1,3 мкм у ширину та 1,5–8 мкм у довжину. Вони нерухомі, не утворюють капсул чи спор, але можуть формувати скупчення. При фарбуванні за Грамом клітини виглядають темно-

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

фіолетовими. Під електронним мікроскопом видно товсту клітинну стінку та фімбрії, які сприяють адгезії [13].

Ріст на живильних середовищах. Біфідобактерії є вимогливими до умов культивування через їх анаеробний метаболізм. Вони ростуть на спеціалізованих середовищах, таких як MRS-агар (з додаванням цистеїну для зниження окислювально-відновного потенціалу), TRY-агар або середовище з лактозою. Колонії дрібні (0,5–2 мм), гладкі, білі або кремові, з матовою поверхнею. На рідких середовищах утворюють осад або слабе помутніння. Оптимальний ріст спостерігається за строго анаеробних умов [13].

Особливості метаболізму. Біфідобактерії є хемоорганогетеротрофами, які використовують біфідний шлях ферментації (фруктозо-6-фосфат-фосфокетотлазний шлях) для метаболізму вуглеводів. Основними субстратами є глюкоза, лактоза, галактоза та олігосахариди (наприклад, фрукто- та галактоолігосахариди). У процесі ферментації утворюються оцтова кислота, молочна кислота (у співвідношенні приблизно 3:2), а також незначна кількість CO₂ і етанолу [7, 24].

Біфідобактерії синтезують вторинні метаболіти, такі як коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), екзополісахариди, бактеріюцини та ферменти (β-галактозидаза). Вони не синтезують вітамін B12, але можуть продукувати фолієву кислоту та інші біологічно активні сполуки, що сприяють здоров'ю господаря [24].

Фактори, що впливають на ріст та розмноження наведені у табл. 2.2 [7, 9, 13, 24].

Таблиця 2.2 – Фактори, що впливають на ріст та розмноження бактерій роду *Bifidobacterium*

Назва фактора	Характеристика фактора
Оптимальні умови:	
Температура	37–40°C (відповідає температурі кишечника людини).
pH	6,5–7,0, хоча вони толерують pH до 4,5 завдяки синтезу органічних кислот.

Поживні речовини	Вуглеводи (лактоза, олігосахариди), пептони, дріжджовий екстракт, вітаміни (особливо біотин), мікроелементи (Mg^{2+} , Mn^{2+}).
Кисень	Строго анаеробні, чутливі до кисню (вимагають низького окислювально-відновного потенціалу).
Лімітуючі фактори:	
Фізичні	Температури вище 45°C або нижче 20°C, високий осмотичний тиск.
Хімічні	Низький рН (<4,0), високі концентрації солей (NaCl >8%), антибіотики (наприклад, тетрациклін).
Біологічні	Конкуренція з іншими мікроорганізмами (наприклад, патогенними бактеріями), бактеріофаги, недостатня кількість пребіотичних субстратів.

Екологічні аспекти зведені у табл. 2.3 [7, 9, 13, 24].

Таблиця 2.3 – Екологічні аспекти бактерій роду *Bifidobacterium*

Фактор	Характеристика
Розповсюдження в природі	Біфідобактерії переважно мешкають у кишечнику людини, ссавців і деяких птахів. Вони домінують у мікробіоті немовлят, що годуються грудним молоком, завдяки здатності метаболізувати олігосахариди молока. У дорослих їх кількість зменшується, але вони залишаються важливими компонентами мікробіоти. У природі біфідобактерії також виявляються в ферментованих молочних продуктах і рідко в ґрунті чи воді.
Взаємозв'язок з іншими організмами	У кишечнику біфідобактерії співпрацюють із молочнокислими бактеріями та іншими коменсалами, синтезуючи КЛЖК, які живлять епітеліальні клітини господаря. Вони конкурують із патогенами (<i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium difficile</i>), пригнічуючи їх ріст шляхом синтезу бактеріоцинів і зниження рН. У молочних продуктах біфідобактерії взаємодіють із пробіотичними штамами (<i>Lactobacillus</i>), сприяючи ферментації.
Функції в екосистемах	Нормалізація мікробіоти кишечника шляхом конкурентного витіснення патогенів. Синтез КЛЖК, які є джерелом енергії для клітин кишечника та мають протизапальну дію. Участь у метаболізмі вуглеводів і

	кругообігу поживних речовин у травному тракті.
Позитивний вплив на людину	Нормалізація мікробіоти кишечника, профілактика дисбактеріозу; синтез КЛЖК (оцтової, молочної кислот), які підтримують бар'єрну функцію кишечника та мають протизапальну дію; імуномодуляція шляхом стимуляції синтезу протизапальних цитокінів і пригнічення алергічних реакцій; синтез фолієвої кислоти та інших біоактивних сполук.
Негативний вплив на людину	У рідкісних випадках біфідобактерії можуть викликати інфекції у людей з імунодефіцитом, хоча це надзвичайно рідкісне явище.

Біфідобактерії широко застосовуються в біотехнології, харчовій промисловості та медицині у складі пробіотиків, функціональних продуктах, для синтезу ферментів (β -галактозидаза) і пребіотичних олігосахаридів.

Таким чином, біфідобактерії є ключовими представниками нормальної мікробіоти кишечника, які відіграють важливу роль у підтримці здоров'я людини. Їх унікальний біфідний шлях ферментації та здатність метаболізувати пребіотики роблять їх цінними для біотехнології. Біфідобактерії синтезують КЛЖК, бактеріюцини та інші метаболіти, які сприяють імуномодуляції, захисту від патогенів і нормалізації мікробіоти. Їх ріст залежить від специфічних умов, що потребує ретельного контролю в промислових процесах. Застосування біфідобактерій у пробіотиках, функціональних продуктах і медицині підкреслює їх значення для сучасної науки та промисловості.

2.3.2 Характеристика пропіоновокислих бактерій

Систематичне положення, еволюційні аспекти розвитку. Пропіоновокислі бактерії (ПКБ) належать до роду *Propionibacterium* (хоча сучасна таксономія відносить частину видів до нових родів, таких як *Cutibacterium* і *Acidipropionibacterium*). Вони входять до класу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, родини *Propionibacteriaceae*. Основні види, що

мають промислове та біотехнологічне значення, включають *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium acidipropionici* та *Propionibacterium jensenii* [9, 15, 37].

Еволюційно ПКБ пов'язані з іншими актинобактеріями, які адаптувалися до анаеробних або мікроаерофільних умов. Їх предки, ймовірно, мешкали в ґрунтових і водних екосистемах, де ферментація органічних сполук була основним джерелом енергії. Генетичні дослідження свідчать про поступову спеціалізацію ПКБ до метаболізму вуглеводів із утворенням пропіонової кислоти, що забезпечило їм конкурентну перевагу в нішах із обмеженим доступом кисню. Сучасна реорганізація таксономії, зокрема виділення *Cutibacterium acnes* (раніше *Propionibacterium acnes*), відображає еволюційні відмінності в метаболізмі та екологічних нішах [37].

Цитологічні особливості. ПКБ є грампозитивними бактеріями з високим вмістом Г+Ц у ДНК (53–68%). Їх клітинна стінка містить пептидоглікан типу A1 γ , з характерними міжпептидними містками, що включають L-діамінопімелінову кислоту. У деяких видів, наприклад *P. freudenreichii*, клітинна стінка містить полісахариди та β -глюкани, які сприяють імуномодулювальним властивостям.

Цитоплазма містить рибосоми, нуклеоїд із кільцевою ДНК та плазмідни (у деяких штамів), які кодують додаткові метаболічні функції, наприклад, стійкість до антибіотиків. ПКБ не утворюють спор, але можуть формувати кокоїдні форми в стаціонарній фазі росту, що підвищує їх стійкість до несприятливих умов. У деяких видів спостерігається наявність псевдомембран, які беруть участь у транспорті метаболітів [7, 9, 37].

Мікроскопічні характеристики. ПКБ мають поліморфну форму – від коротких паличок (0,5–1,5 мкм завдовжки) до кокоїдних або розгалужених форм, що нагадують актиноміцети. Вони нерухомі, не утворюють капсул і спор, але можуть формувати грампозитивні скупчення. При фарбуванні за Грамом клітини виглядають темно-фіолетовими. Під електронним

мікроскопом видно товсту клітинну стінку та іноді пілі, які беруть участь в адгезії [7, 9, 37].

Ріст на живильних середовищах. ПКБ ростуть на багатих поживних середовищах, таких як молочно-казеїновий агар, MRS (з лактозою) або середовище з глюкозою. Оптимальний ріст спостерігається за анаеробних умов, хоча деякі штами толерують мікроаерофільні умови. Колонії на агаризованих середовищах дрібні (1–3 мм), гладкі, кремові, рожеві або червонуваті (завдяки пігментам порфіринового типу). На рідких середовищах утворюють рівномірне помутніння або осад.

Особливості метаболізму. ПКБ є хемоорганогетеротрофами, які використовують ферментацію для отримання енергії. Основним метаболічним шляхом є пропіонова ферментація, під час якої вуглеводи (глюкоза, лактоза, фруктоза) або органічні кислоти (лактат) перетворюються на пропіонову кислоту, оцтову кислоту, вуглекислий газ і воду. Ключовий фермент – метилмалоніл-CoA декарбоксилаза – забезпечує перетворення пірувату в пропіонат через цикл Вуда–Веркмана [7, 9, 37].

ПКБ також синтезують вторинні метаболіти, такі як 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнова кислота (DHNA), вітамін B12 (кобаламін), бактеріоцини та ферменти (каталаза, ліпази). Деякі штами здатні до анаеробного дихання з використанням нітратів як акцепторів електронів [30, 37].

Фактори, що впливають на ріст та розмноження наведені у табл. 2.4 [5, 7, 9, 30, 37].

Таблиця 2.4 – Фактори, що впливають на ріст та розмноження бактерій роду *Propionibacterium*

Назва фактора	Характеристика фактора
Оптимальні умови:	
Температура	28–32°C (для більшості штамів, наприклад, <i>P. freudenreichii</i>).
pH	6,5–7,0, хоча ПКБ толерують pH до 4,5 завдяки синтезу органічних кислот.
Поживні речовини	Вуглеводи (глюкоза, лактоза), пептони, дріжджовий екстракт, мікроелементи (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} для

	синтезу вітаміну B12).
Кисень	Анаеробні або мікроаерофільні умови (надлишок кисню пригнічує ріст).
Лімітуючі фактори:	
Фізичні	Температури вище 45°C або нижче 10°C, високий осмотичний тиск.
Хімічні	Низький рН (<4,0), високі концентрації солей (NaCl >10%), присутність антибіотиків (наприклад, пеніциліну).
Біологічні	Конкуренція з іншими мікроорганізмами (наприклад, молочнокислими бактеріями), бактеріофаги, які можуть інфікувати ПКБ.

Екологічні аспекти зведені у табл. 2.5 [5, 7, 9, 30, 37].

Таблиця 2.5 – Екологічні аспекти бактерій роду *Propionibacterium*

Фактор	Характеристика
Розповсюдження в природі	ПКБ широко поширені в природних екосистемах, зокрема в ґрунті, молочних продуктах, силосі, рубці жуйних тварин і кишечнику людини. Вони є частиною мікробіоти шкіри (<i>Cutibacterium acnes</i>) та шлунково-кишкового тракту.
Взаємозв'язок з іншими організмами	У рубці жуйних ПКБ беруть участь у ферментації целюлози, синтезуючи пропіонову кислоту, яка є джерелом енергії для господаря. У сироварінні (<i>P. freudenreichii</i>) взаємодіють із молочнокислими бактеріями, сприяючи дозріванню сирів. <i>C. acnes</i> на шкірі людини може бути як комменсалом, так і умовно-патогенним мікроорганізмом, викликаючи акне за певних умов.
Функції в екосистемах	Деградація органічних сполук у ґрунті та воді. Синтез метаболітів, які пригнічують патогенні мікроорганізми (антагоністична дія). Участь у кругообігу вуглецю шляхом ферментації.
Позитивний вплив на людину	ПКБ синтезують пропіонову кислоту, яка має протизапальні властивості та підтримує здоров'я кишечника. Вироблення вітаміну B12, необхідного для кровотворення та нервової системи. Метаболіти, такі як DHNA, стимулюють ріст біфідобактерій, нормалізуючи

	мікробіоту.
Негативний вплив на людину	Cutibacterium acnes асоціюється з акне та іншими шкірними інфекціями. У рідкісних випадках ПКБ можуть викликати ендокардит або інфекції у людей з ослабленим імунітетом.

ПКБ мають широке застосування в біотехнології, харчовій промисловості та медицині:

Сироваріння: *P. freudenreichii* використовується для виробництва твердих сирів (Емменталь, Маасдам), де синтезує CO₂, формуючи «очі» в сирі, та пропіонову кислоту, що додає характерний смак.

Виробництво вітаміну B12: ПКБ є основними промисловими продуцентами кобаламіну.

Метабіотики: Супернатанти культуральних рідин застосовуються як функціональні інгредієнти з пробіотичними властивостями.

Біоконсерванти: Пропіонова кислота та бактеріюцини пригнічують ріст патогенів у харчових продуктах.

Медицина: Розробка препаратів на основі метаболітів ПКБ для імуномодуляції та профілактики дисбактеріозу.

Біотехнологія: Використання у виробництві органічних кислот, ферментів і біопалива [5, 7, 9, 30, 37].

Таким чином, пропіоновокислі бактерії є унікальними мікроорганізмами з широким спектром біотехнологічного застосування. Їх особливості метаболізму (пропіонова ферментація) та екологічна роль у природі роблять важливими для науки та промисловості. ПКБ синтезують цінні метаболіти, такі як пропіонова кислота, вітамін B12 і DHNA, які мають позитивний вплив на здоров'я людини та використовуються у виробництві продуктів харчування, ліків і біоконсервантів. Водночас їх ріст залежить від низки фізичних, хімічних і біологічних факторів, що потребує оптимізації умов культивування для промислового застосування.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

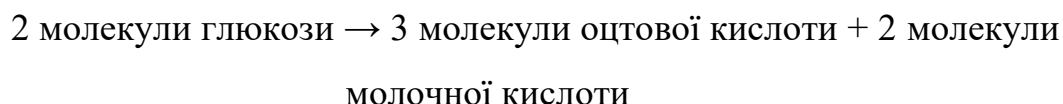
2.4 Біосинтез цільового продукту

Цільовим продуктом у цій роботі виступають метаболіти культуральної рідини біфідобактерій штаму *Bifidobacterium longum* та *Propionibacterium shermanii*, що містять велику кількість речовин, що утворюються в процесі метаболізму. Тому розглянемо реакції метаболізму цих штамів, в результаті яких утворюються речовини, що і володіють позитивним впливом на людину та мікробіом людини.

Bifidobacterium longum використовує біфідний шлях ферментації для метаболізму вуглеводів. Цей шлях дозволяє отримувати енергію в анаеробних умовах, утворюючи оцтову та молочну кислоти як основні продукти. Нижче детально описано етапи біфідного шляху, реакції, ферменти та метаболіти.

Біфідний шлях – це анаеробний процес, який використовує вуглеводи (глюкоза, лактоза, олігосахариди) для синтезу енергії. Ключовим ферментом є фруктозо-6-фосфат-фосфокетолаза, яка розщеплює фруктозо-6-фосфат на еритрозо-4-фосфат і ацетилфосфат. Основні продукти – оцтова кислота (ацетат, ~60%) і молочна кислота (лактат, ~40%) [7, 9, 24].

Загальне рівняння ферментації:



Характеристика метаболізму біфідобактерій зведено у табл. 2.6 [7, 9, 24].

Таблиця 2.6 – Характеристика реакцій метаболізму біфідобактерій

Назва реакції	Процес	Реакція	Фермент	Продукт
1. Транспорт і активація глюкози	Глюкоза поглинається через мембранні транспортери і фосфорилується для активації.	Глюкоза + АТФ → Глюкоза-6-фосфат + АДФ	Гексокіназа (ЕС 2.7.1.1) або глюкокіназа (ЕС 2.7.1.2)	Глюкоза-6-фосфат
2. Перетворення глюкози-6-фосфату на фруктозо-6-фосфат	Глюкоза-6-фосфат ізомеризується для підготовки до ключового етапу.	Глюкоза-6-фосфат ↔ Фруктозо-6-фосфат	Глюкозо-6-фосфат ізомераза (ЕС 5.3.1.9)	Фруктозо-6-фосфат

3. Ключовий етап: Розщеплення фруктозо-6-фосфату	Фруктозо-6-фосфат розщеплюється на два продукти, що визначає унікальність біфідного шляху.	Фруктозо-6-фосфат → Еритрозо-4-фосфат + Ацетилфосфат	Фруктозо-6-фосфат-фосфокетолаза (ЕС 4.1.2.22)	Еритрозо-4-фосфат, Ацетилфосфат
4. Перетворення ацетилфосфату в оцтову кислоту	Ацетилфосфат перетворюється в оцтову кислоту з утворенням АТФ.	Ацетилфосфат + АДФ → Оцтова кислота + АТФ	Ацетаткіназа (ЕС 2.7.2.1)	Оцтова кислота (ацетат), АТФ
5. Метаболізм еритрозо-4-фосфату	Еритрозо-4-фосфат перетворюється через реакції, подібні до пентозофосфатного шляху, для синтезу гліцеральдегід-3-фосфату.	Перетворення еритрозо-4-фосфату та фруктозо-6-фосфату: Еритрозо-4-фосфат + Фруктозо-6-фосфат → Гліцеральдегід-3-фосфат + Рибозо-5-фосфат. Перетворення рибозо-5-фосфату: Рибозо-5-фосфат ↔ Ксилулозо-5-фосфат	Транскетолаза (ЕС 2.2.1.1), Трансальдолаза (ЕС 2.2.1.2) Рибозо-5-фосфат ізомераза (ЕС 5.3.1.6)	Гліцеральдегід-3-фосфат, Рибозо-5-фосфат
6. Перетворення гліцеральдегід-3-фосфату в молочну кислоту	Гліцеральдегід-3-фосфат метаболізується до пірувату, який відновлюється до молочної кислоти.	Окислення гліцеральдегід-3-фосфату: Гліцеральдегід-3-фосфат + NAD ⁺ + P _i → 1,3-Бісфосфогліцерат + NADH + H ⁺ . Субстратне фосфорилування: 1,3-Бісфосфогліцерат + АДФ → 3-Фосфогліцерат	Гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (ЕС 1.2.1.12) Фосфогліцераткіназа (ЕС 2.7.2.3) Фосфогліцератмут аза (ЕС 5.4.2.1), Енолаза (ЕС 4.2.1.11), Піруваткіназа (ЕС 2.7.1.40) Лактатдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.27)	Молочна кислота (лактат)

		+ АТФ. Перетворення 3-фосфогліцерату в піруват: 3-Фосфогліцерат → 2-Фосфогліцерат → Фосфоенолпіруват → Піруват. Відновлення пірувату до молочної кислоти: Піруват + NADH + H ⁺ → Молочна кислота + NAD ⁺		
--	--	--	--	--

Залежно від умов, частина ацетилфосфату чи пірувату може спрямовуватися через додаткові метаболічні шляхи на синтез етанолу або форміату.

Утворення етанолу: Ацетил-КоА + 2NADH + 2H⁺ → Етанол + 2NAD⁺

Ферменти: Ацетил-КоА редуктаза, Алкогольдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.1).

Утворення форміату: Піруват → Форміат + Ацетил-КоА

Фермент: Піруват-форміат ліаза (ЕС 2.3.1.54).

Продукти: Етанол, Форміат [7, 9, 24].

Таким чином основними метаболітами при культивуванні біфідобактерій є: оцтова кислота (ацетат): ~60%, знижує рН, пригнічує патогени, живить епітеліальні клітини; молочна кислота (лактат): ~40%, знижує рН, має антагоністичну дію; етанол: незначна кількість за низького рН; форміат: побічний продукт за певних умов; вуглекислий газ (CO₂): у невеликих кількостях; екзополісахариди: сприяють адгезії та імуномодуляції; бактеріоцини: антимікробні пептиди проти патогенів; фолієва кислота: біоактивна сполука для метаболізму господаря.

Енергетичний вихід - на 2 молекули глюкози утворюється 2,5–3 АТФ через субстратне фосфорилування, що компенсується ефективним використанням складних вуглеводів.

Серед важливих особливостей метаболізму біфідобактерій, які слід враховувати при розробці технології метабіотика, слід зазначити: адаптація до олігосахаридів - гени кодують ферменти (β -галактозидаза, α -глюкозидаза) для гідролізу пребіотиків; регуляція - залежить від рН і субстратів; за низького рН можливий синтез етанолу/форміату [24].

Таким чином, біфідний шлях *Bifidobacterium longum* забезпечує ефективний метаболізм вуглеводів із утворенням оцтової та молочної кислот. Ацетат і лактат пригнічують патогени, ацетат підтримує крос-фідинг із корисними бактеріями. Ключові ферменти – фруктозо-6-фосфат-фосфокетоксилаза, ацетаткіназа, лактатдегідрогеназа – каталізують реакції, що генерують енергію та біоактивні метаболіти. Ці продукти сприяють здоров'ю кишечника, роблячи *B. longum* цінним для пробіотичних застосувань.

Propionibacterium shermanii є ключовим учасником пропіоновокислого бродіння. Цей метаболічний шлях дозволяє бактерії отримувати енергію шляхом ферментації вуглеводів (зокрема лактози чи глюкози) з утворенням пропіонової кислоти як основного продукту. Окрім первинних метаболітів, бактерія синтезує вторинні метаболіти, такі як 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнова кислота (DHNA), які мають важливе біологічне значення [7, 9, 36, 37].

Пропіоновокисле бродіння – це анаеробний метаболічний процес, у якому *P. shermanii* ферментує вуглеводи (глюкоза, лактоза) або лактат до пропіонової кислоти, оцтової кислоти, вуглекислого газу (CO_2) та інших метаболітів. Процес включає два основні етапи: гліколіз (перетворення глюкози до пірувату) та пропіонатний цикл (перетворення пірувату до пропіонової кислоти через цикл Вуда-Веркмана). Основними продуктами є пропіонова кислота (~60%), оцтова кислота (~20%) і CO_2 , які визначають промислове значення бактерії [7, 9, 36, 37].

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

Загальне рівняння пропіоновокислого бродіння для глюкози: 3 молекули глюкози $\rightarrow$ 4 молекули пропіонової кислоти + 2 молекули оцтової кислоти + 2 молекули CO_2 + 2 молекули H_2O .

Пропіоновокисле бродіння можна поділити на два основні етапи: гліколіз і пропіонатний цикл [7, 9, 36, 37].

Перетворення глюкози до пірувату описано вище. Пропіонатний цикл (цикл Вуда-Веркмана) - піруват спрямовується на два паралельні шляхи: один веде до пропіонової кислоти через пропіонатний цикл, інший – до оцтової кислоти.

Пропіонатний цикл включає перетворення пірувату через низку карбоксилювання, ізомеризації та відновлення, наведено у табл. 2.7 [7, 9, 36, 37]. Продуктами є пропіонова кислота, CO_2 , АТФ.

Таблиця 2.7 – Характеристика реакцій пропіонатного циклу пропіоновими бактеріями

Назва реакції	Реакція	Фермент
Карбоксилювання пірувату до оксалоацетату	Піруват + CO_2 + АТФ $\rightarrow$ Оксалоацетат + АДФ + Pi	Піруваткарбоксилаза (EC 6.4.1.1)
Перетворення оксалоацетату до малату	Оксалоацетат + NADH + H^+ $\rightarrow$ Малат + NAD $^+$	Малатдегідрогеназа (EC 1.1.1.37)
Дегідратація малату до фумарату	Малат $\rightarrow$ Фумарат + H_2O	Фумараза (EC 4.2.1.2)
Відновлення фумарату до сукцинату	Фумарат + NADH + H^+ $\rightarrow$ Сукцинат + NAD $^+$	Фумаратредуктаза (EC 1.3.1.6)
Перетворення сукцинату до сукциніл-КоА	Сукцинат + КоА + АТФ $\rightarrow$ Сукциніл-КоА + АДФ + Pi	Сукциніл-КоА синтетаза (EC 6.2.1.5)
Перетворення сукциніл-КоА до метилмалонил-КоА	Сукциніл-КоА $\leftrightarrow$ Метилмалонил-КоА	Метилмалонил-КоА мутаза (EC 5.4.99.2), кофермент – вітамін B12 (кобаламін)
Ізомеризація метилмалонил-КоА	L-Метилмалонил-КоА $\leftrightarrow$ D-Метилмалонил-КоА	Метилмалонил-КоА епімераза (EC 5.1.99.1)
Перетворення метилмалонил-КоА до пропіонил-КоА	D-Метилмалонил-КоА $\rightarrow$ Пропіонил-КоА + CO_2	Метилмалонил-КоА декарбоксилаза (EC 4.1.1.41)
Перетворення пропіонил-КоА до пропіонової кислоти	Пропіонил-КоА + АДФ + Pi $\rightarrow$ Пропіонова кислота + КоА + АТФ	Пропіонил-КоА трансфераза (EC 2.8.3.1)

Частина пірувату спрямовується на синтез оцтової кислоти для забезпечення додаткової енергії та балансу NADH/NAD⁺, реакції зведені у табл. 2.8 [7, 9, 36, 37]. Основними продуктами є оцтова кислота, АТФ, CO₂.

Таблиця 2.8 – Характеристика реакцій утворення оцтової кислоти пропіоновими бактеріями

Назва реакції	Реакція	Фермент
Перетворення пірувату до ацетил-КоА	Піруват + КоА + NAD ⁺ → Ацетил-КоА + CO ₂ + NADH + H ⁺	Піруватдегідрогеназа (EC 1.2.4.1)
Перетворення ацетил-КоА до ацетилфосфату	Ацетил-КоА + Pi → Ацетилфосфат + КоА	Фосфотрансацетилаза (EC 2.3.1.8)
Перетворення ацетилфосфату до оцтової кислоти	Ацетилфосфат + АДФ → Оцтова кислота + АТФ	Ацетаткіназа (EC 2.7.2.1)

Таким чином основними метаболітами пропіоновокислого бродіння є пропіонова кислота (пропіонат) - основний продукт (~60%), пригнічує патогени, є джерелом енергії для клітин кишечника; оцтова кислота (ацетат) - ~20%, знижує рН, живить епітеліальні клітини, має антимікробну дію; вуглекислий газ (CO₂) - утворюється в процесі декарбоксилювання, відповідає за “очі” в швейцарських сирах; вода (H₂O) - побічний продукт реакцій; АТФ - генерується через субстратне фосфорилування (~3 АТФ на молекулу глюкози).

Важливим вторинним метаболітом, який утворюється пропіоновокислими бактеріями є 1,4-Дигідроксі-2-нафтоїнова кислота (DHNA). 1,4-Дигідроксі-2-нафтоїнова кислота (DHNA) – вторинний метаболіт, який синтезується *P. shermanii* через шикіматний шлях і біосинтез менахінонів (вітаміну K₂). DHNA є проміжним продуктом у синтезі менахінонів, але сама по собі має біологічну активність [36].

Шикіматний шлях починається з перетворення глюкози через гліколіз і пентозофосфатний шлях до шикімату, далі відбувається формування 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти - ізохоризмат з'єднується з сукциніл-КоА або іншими проміжними метаболітами пропіонатного циклу, утворюючи

DHNA, табл. 2.9.

Таблиця 2.8 – Характеристика реакцій шикіматного шляху пропіоновими бактеріями та утворення DHNA

Назва реакції	Реакція	Фермент
Утворення шикімату	Фосфоенолпіруват + Еритрозо-4-фосфат → Шикімат	ДАНР синтетаза (EC 2.5.1.54), шикіматкіназа (EC 2.7.1.71)
Перетворення шикімату до хоризмата	Шикімат → Хоризмат	Хоризматсинтаза (EC 4.2.3.5)
Синтез ізохоризмата	Хоризмат → Ізохоризмат	Ізохоризматсинтаза (EC 5.4.4.2)
Утворення DHNA	Ізохоризмат + Сукциніл-КоА → DHNA + КоА	Менахінон біосинтетична синтаза (MenD, EC 2.2.1.9)

Можливий подальший синтез менахінонів (за потреби) - DHNA може бути модифікована для утворення менахінонів, ферменти - MenA, MenB (EC 2.5.1.74, EC 4.1.3.36). Синтез DHNA залежить від рівня вуглеводів, pH і доступності коферментів (наприклад, КоА). У промислових умовах синтез посилюється за високої концентрації лактози. Значення DHNA зведено у табл. 2.10 [36].

Таблиця 2.10 - Значення DHNA

Пробіотична активність	DHNA стимулює ріст Bifidobacterium у кишечнику, діючи як біфідогенний фактор. Вона активує рецептори, які сприяють проліферації корисної мікрофлори
Імуномодуляція	DHNA має протизапальну дію, зменшуючи синтез прозапальних цитокінів (TNF-α) і стимулюючи секрецію IgA
Антиоксидантні властивості	Завдяки гідроксильним групам DHNA нейтралізує вільні радикали, захищаючи клітини від оксидативного стресу
Промислове значення	DHNA використовується у виробництві функціональних продуктів і добавок для підтримки здоров'я кишечника
Попередник менахінонів	DHNA є ключовим проміжним продуктом у синтезі вітаміну K2, який важливий для згортання крові та метаболізму кальцію

Для формування метабіотика фажливими є і інші вторинні метаболіти, серед яких: трегалоза - дисахарид, який захищає клітини від стресу

(осмотичного, термічного); бактеріюцини - антимікробні пептиди, що пригнічують ріст патогенів (*Listeria*, *Staphylococcus*); полісахариди - сприяють адгезії до слизової кишечника та імуномодуляції.

Пропіоновокисле бродіння генерує ~ 3 АТФ на молекулу глюкози: 2 АТФ від гліколізу та додатковий АТФ від субстратного фосфорилування в пропіонатному циклі та синтезі ацетату. Ефективність залежить від балансу NADH/NAD^+ і рівня CO_2 .

Серед важливих особливостей метаболізму *P. shermanii*, які слід враховувати при розробці технології метабіотика, слід зазначити: адаптація до лактози - *P. shermanii* ефективно метаболізує лактат (з молочних продуктів) як альтернативний субстрат; залежність від вітаміну B12 - пропіонатний цикл потребує кобаламіну для роботи метилмалонил-КоА мутази; роль CO_2 - вуглекислий газ регулює рН середовища; метаболізм залежить від рН, концентрації субстратів і анаеробних умов.

Таким чином, пропіоновокисле бродіння *Propionibacterium shermanii* – складний метаболічний процес, що включає гліколіз і пропіонатний цикл, з утворенням пропіонової кислоти, оцтової кислоти та CO_2 . Ключові ферменти – піруваткарбоксилаза, метилмалонил-КоА мутаза, ацетаткіназа – забезпечують ефективне перетворення субстратів. Вторинні метаболіти, зокрема DHNA, відіграють важливу роль у пробіотичній активності, імуномодуляції та промислових застосуваннях. Метаболіти бродіння та DHNA роблять *P. shermanii* цінною для харчової промисловості та біотехнології та важливою речовиною при організації даної технології.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок витрат компонентів

Розрахунок компонентів середовища проведемо за кількістю живильного середовища, потрібного для реалізації вирощування мікроорганізмів *B. longum* та *P. shermanii* для отримання метабіотика. У табл. 3.1 наведено потреби у живильних середовищах з урахуванням втрат на стадіях 2-5.

Таблиця 3.1

Витрати живильного середовища по стадіях

Стадія	Витрати середовища на стадії, л	Витрати середовища на стадії з врахуванням втрат, л
Стадія 2. Підготовка посівного матеріалу	$0,095 \cdot 6 + 0,67 \cdot 2 = 1,91$	2,01
Стадія 3. Вирощування інокуляту <i>B. longum</i>	13,3	13,97
Стадія 4. Вирощування інокуляту <i>P. shermanii</i>	13,3	13,97
Стадія 5. Виробниче культивування	532	558,6

На 1 серію потрібно 588,55 л ферментаційного середовища, враховуючи густину середовища 1,01 г/мл, маса складає 594,44 кг. На стадії 6 до супернатанта у кількості 475 л додають захисне середовище у кількості 25 л, враховуючи густину середовища 1,1 г/мл, маса складає 27,5 кг. Згідно виробничої рецептури розрахуємо витрати кожного компоненту ферментаційного середовища та захисного середовища на 1 серію продукту (табл. 3.2).

Витрати компонентів середовища на 1 серію продукту

Компонент	Склад, мас. %	Витрати на 1 серію, кг
Ферментаційне середовище:	100	594,44
соева сироватка	3	17,83
агар-агар	0,25	1,49
сирна сироватка	0,1	0,59
пептон	0,1	0,59
натрій лимоннокислий тризаміщений	0,6	3,57
калій фосфорнокислий однозаміщений	0,17	1,01
магній сірчанокислий	0,12	0,71
аскорбінова кислота	0,05	0,30
вода дистильована	95,63	568,05
Захисне середовище:	100	27,5
сахароза	50	13,75
желатоза	25	6,875
молоко	25	6,875

3.2 Обґрунтування та розрахунок параметрів обладнання

Виробництво метабіотика на основі продуктів життєдіяльності двох видів мікроорганізмів *B. longum* та *P. shermanii* організується на фармацевтичному підприємстві ТОВ «БІОЛІК ФАРМА», яке було одним із перших в Україні, що займалось розробкою пробіотичних препаратів, зокрема Біфідумбактерина, Лактобактерина, Колібактерина. На підприємстві облаштовані виробнича лабораторії для роботи з культурами, дільниця ферментації з інокуляторами та ферментерами, дільниця відділення та виділення із сеператором, промисловою центрифугою, фільтрами та дільниця ліофілізації, які необхідні для виробництва метабіотика. Розрахуємо параметри обладнання для проведення процесу, враховуючи, що об'єм запланованої 1 серії складає 100 тис. флаконів по 5 мл, для наповнення яких на стадії наповнення та ліофілізації потрібно 500 л інактивованої культуральної рідини змішаної культури – супернатанта після

центрифугування. Відсоткове співвідношення осаду (пелети) та супернатанту після центрифугування культуральної рідини, що містить продукти життєдіяльності та мікроорганізми, залежить від кількох факторів, таких як тип мікроорганізмів, їх концентрація, склад культуральної рідини, швидкість і тривалість центрифугування, а також тип центрифуги [11]. Точних універсальних відсотків для всіх випадків не існує, але можна надати загальну оцінку на основі типових лабораторних практик, досвіду проведення подібних етапів на підприємстві і даних із літератури. Осад (пелета) зазвичай становить невелику частку від загального об'єму культуральної рідини, оскільки мікроорганізми та їхні продукти життєдіяльності, які осідають, мають значно менший об'єм порівняно з рідиною [11, 14]. У більшості випадків осад може складати від 1% до 20% від загального об'єму, залежно від концентрації клітин та умов центрифугування.

Фактори, що впливають на кількість утвореного осаду біомаси при центрифугуванні: щільність і розмір мікроорганізмів; швидкість центрифугування - вищі значення g (наприклад, $10000 \times g$ або більше) сприяють кращому осадженню, що може збільшити відсоток осаду (нами пропонується 10000 об/хв протягом 10-15 хв); час центрифугування - довший час може збільшити кількість осаду, але зазвичай не значно впливає на відсоткове співвідношення; в'язкість середовища - висока в'язкість (наприклад, у культурах із високим вмістом метаболітів) може зменшити ефективність осадження, залишаючи більше частинок у супернатанті; концентрація клітин - культури з високою щільністю (наприклад, 10^8 – 10^9 клітин/мл) дають більший об'єм осаду порівняно з розрідженими культурами, наприклад, для бактеріальних культур із низькою щільністю (10^6 КУО/мл) осад може бути менш як 5%, для високої щільності (10^8 клітин/мл або більше, як у промислових біореакторах) осад може досягати 10–20% або більше. Із урахуванням високої щільності клітин у культуральній рідині та можливості промислової центрифуги, що наявна на підприємстві, забезпечувати високі

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

параметри роботи, прийmemo за відсоток осаду – 10 %, тоді з ферментеру на центрифугу повинно бути подано 555 л культуральної рідини [11, 14].

З урахуванням втрат при перекачуванні загальний вміст у виробничому ферментері (культуральна рідина з біомасою клітин) складає 560 л. Враховуючи коефіцієнт заповнення ферментера 0,6-0,7, об'єм ферментера повинен бути 800-935 л, згідно з табличними даними номінальний об'єм ферментера 1000 л.

Розрахуємо, об'єми інокуляторів, в яких відбувається підготовка інокуляту культур біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій у співвідношенні 1:1, кількість посівного матеріалу на кожній стадії 5 %, втрати, обумовлені крапливиносом, на кожній стадії 5 %.

Отже, вміст виробничого ферментеру (змішана культура) складає $x \cdot 0,05 + x = 560$ л, тоді кількість живильного середовища 532 л, а посівного матеріалу – 28 л. Посівний матеріал подається із інокулятора з біфідобактеріями та інокулятора з пропіоновокислими бактеріями у співвідношенні 1:1. Отже, у кожному інокуляторі (III генерація) готується по 14 л інокуляту ($x \cdot 0,05 + x = 14$ л). До інокулятора подається 13,3 л свіжого живильного середовища та 0,7 л посівного матеріала. Номінальний об'єм кожного інокулятора $14/0,7 = 20$ л.

Посівний матеріал до кожного інокулятора подається із колб (II генерація). Тоді вміст колб складає $x \cdot 0,05 + x = 0,7$ л, звідки кількість свіжого живильного середовища у колбі – 0,67 л, посівного матеріалу – 0,03 л. Номінальний об'єм кожної колби 1 л. Посівним матеріалом для колб є культура, вирощена у пробірках. У виробничій лабораторії робиться посів у пробірку із 9,5 мл свіжого середовища та 0,5 мл регідратованої культури (I генерація). Таким чином, для забезпечення посіву у колби потрібні 3 пробірки із відповідною культурою.

Таким чином, процес вирощування здійснюється:

I генерація *B. longum* - у пробірках (3 шт), I генерація *P. shermanii* - у

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

пробірках (3 шт),

II генерація *B. longum* - у колбах (1 л), II генерація *P. shermanii* - у колбах (1 л),

III генерація *B. longum* – в інокуляторі (20 л), III генерація *P. shermanii* – в інокуляторі (20 л),

змішана культура – у виробничому ферментері (1000 л).

Враховуючи анаеробні умови проведення процесу оснащення ферментера барботером не потрібно. Обігрів реакційного середовища та відведення тепла забезпечується подачею гарячої та холодної води у пароводяну сорочку. Перемішування вмісту ферментера – не тривале, потрібне при додаванні компонентів у ферментер, тому обираємо тихохідну мішалку із швидкістю 10-100 об/хв. Обв'язка ферментера забезпечує автоматичне регулювання рН подачею розчинів, наявність манометру, термометру, рівноміру [10, 14].

На стадії 1. Приготування ферментаційного середовища використовується реактор із системою стерилізації на місці (SIP) та охолодження.

Характеристики:

Об'єм: - 1000 л.

Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L (стійка до корозії, відповідає GMP).

Система перемішування: магнітна або механічна мішалка (10–200 об/хв) для гомогенізації.

Система нагріву: парова сорочка для нагріву до 120 °С.

Система охолодження: водяна або гліколева сорочка для швидкого зниження температури до 30–35 °С.

Контроль: автоматизована система управління температурою, тиском і часом стерилізації.

Асептичність: SIP-система (стерилізація паром при 121 °С, 1,1 бар).

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

Специфікація:

Модель: Sartorius Biostat D-DCU 1000L.

Матеріал: AISI 316L.

Температурний діапазон: 20–150 °С.

Тиск: до 3 бар.

Потужність мішалки: 1–2 кВт.

Система управління: PLC (Programmable Logic Controller) з сенсорним екраном.

Виробник: Sartorius, Applikon, Eppendorf (наявність у ТОВ "БІОЛІК ФАРМА").

На стадії 2. Підготовка посівного матеріалу потрібне обладнання для асептичної роботи, інкубації, вирощування та контролю температури. Використовується ламінарний бокс (клас II), термостат, шейкер-інкубатор.

Ламінарний бокс (клас II). Специфікація:

Клас чистоти: ISO 5 (клас 100 за GMP).

HEPA-фільтри для забезпечення стерильності.

Робоча зона: $\geq 1 \text{ м}^2$.

УФ-лампа для додаткової стерилізації.

Клас: II, тип A2.

Розмір робочої зони: 1200 × 600 мм.

Фільтрація: HEPA H14 (99,995% ефективність).

Модель: Thermo Scientific MSC-Advantage.

Виробник: Thermo Scientific, Esco, Telstar.

Термостат (інкубатор). Специфікація:

Температурний діапазон: 20–60 °С ($\pm 0,1$ °С).

Об'єм: ≥ 100 л (для розміщення кількох колб і пробірок).

Контроль вологості: 70–90% для стабільного росту.

Система циркуляції повітря для рівномірного нагріву.

Об'єм: 100–150 л.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

Модель: Memmert IN110.

Виробник: Memmert, Binder, Eppendorf.

Лабораторний шейкер-інкубатор. Специфікація:

Швидкість обертання: 50–250 об/хв.

Температурний діапазон: 20–50 °C.

Об'єм: можливість розміщення ≥ 4 колб по 1 л.

Автоматизований контроль температури та швидкості.

Швидкість: 50–250 об/хв.

Модель: Infors HT Multitron

Виробник: Infors HT, Thermo Scientific, Eppendorf.

На стадії 3. Вирощування інокуляту *B. longum* та Стадії 4. Вирощування інокуляту *P. shermanii* потрібен ферментер із точним контролем параметрів.

Інокулятор (лабораторний ферментер) – 2 шт. Специфікація:

Об'єм: 20 л.

Матеріал: AISI 316L.

Система перемішування: магнітна або механічна мішалка (100–300 об/хв).

Контроль pH: датчик pH із автоматичною корекцією (дозування лугу/кислоти).

pH: 2–12 ($\pm 0,01$).

Контроль температури: 20–50 °C ($\pm 0,1$ °C).

Температура: 20–50 °C.

Система SIP/CIP (стерилізація/очищення на місці).

Модель: Sartorius Biostat B 20L.

Виробник: Sartorius, Applikon, Bioengineering.

На стадії 5. Виробниче культивування змішаної культури потрібен промисловий ферментер із точним контролем параметрів.

Специфікація:

Матеріал: AISI 316L.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

Система перемішування: механічна мішалка (50–200 об/хв).

Контроль pH: автоматична корекція (дозування NaOH/HCl).

Контроль температури: 20–50 °C ($\pm 0,1$ °C).

Система SIP/CIP.

Датчики: pH, температура, піна.

pH: 2–12 ($\pm 0,01$).

Об'єм: 1000 л.

Потужність мішалки: 5–10 кВт.

Модель: Bioengineering KLF 1000L.

Виробник: Bioengineering, Sartorius, Applikon.

На стадії 6. Відділення культуральної рідини потрібні промислова декантерна центрифуга для ефективного відділення біомаси від культуральної рідини.

Специфікація:

Відносна відцентрова сила (RCF): 10000–15000 $\times g$.

Матеріал: AISI 316L.

Тип: безперервна або періодична дія.

Система CIP для очищення.

Автоматизоване управління швидкістю та часом.

Продуктивність: 600–1000 л/год.

Потужність: 10–20 кВт.

Модель: GEA Westfalia Separator.

Виробник: GEA, Alfa Laval, Flottweg.

На стадії 7. Інактивація культуральної рідини потрібна пастеризаційна установка з точним контролем температури.

Специфікація:

Тип: пластинчастий теплообмінник (для високої ефективності).

Температура: 50–100 °C ($\pm 0,5$ °C).

Час пастеризації: 30 хв (можливість налаштування).

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						55
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Матеріал: AISI 316L.

Система СІР.

Продуктивність: 600–1000 л/год.

Потужність: 15–25 кВт.

Модель: Tetra Pak Pasteurizer BC.

Виробник: Tetra Pak, Alfa Laval, SPX Flow.

На стадії 8. Наповнення та ліофілізація інактивованої культуральної рідини потрібна система змішування та дозування та ліофільна сушарка.

Система змішування та дозування:

Модель: Bosch FLK 6060 г.

Об'єм: 500–600 л.

Точність дозування: ± 1 мл.

Матеріал: AISI 316L.

Виробник: Bosch, Bausch+Ströbel, ІМА.

Ліофільна сушарка:

Об'єм камери: ≥ 2 м³ (для обробки ~500 л рідини у флаконах).

Температура: -50 до +50 °С.

Вакуум: 0,1–10 мбар.

Час циклу: 20–24 год (12 год заморожування + 8–8,5 год сушка).

Матеріал: AISI 316L.

Автоматизоване управління.

Температура: -50 до +50 °С.

Потужність: 20–30 кВт.

Модель: GEA Lyovac FCM 10.

Виробник: GEA, Telstar, Labconco.

Стадія 9. Закупорювання флаконів

Автоматизована лінія закупорки:

Тип ковпачків: алюмінієві або пластикові (залежно від дизайну).

Матеріал: AISI 316L (контактні частини).

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

Асептичність: робота в чистій зоні (ISO 7 або вище).

Автоматизоване управління.

Продуктивність: 1000–2000 флаконів/год.

Матеріал: AISI 316L.

Тип ковпачків: алюмінієві/пластикові.

Модель: Bausch+Ströbel KFM 8020.

Виробник: Bausch+Ströbel, IMA, Bosch.

На стадії 10. Пакування та маркування потрібна автоматизована лінія для маркування та пакування.

Специфікація:

Продуктивність: ≥ 1000 флаконів/год.

Тип етикеток: самоклеючі, з можливістю нанесення штрих-кодів.

Пакування: картонні коробки по 10 флаконів.

Система контролю якості: перевірка правильності маркування.

Матеріал: AISI 304/316L (контактні частини).

Продуктивність: 1000–2000 флаконів/год.

Тип етикеток: самоклеючі.

Пакування: 10 флаконів/коробка.

Модель: Marchesini ML 600.

Виробник: Marchesini, IMA, Bosch.

Для організації виробництва на ТОВ «БІОЛІК ФАРМА» наявне все необхідне обладнання, але продуктивність центрифуги, що стоїть в цеху відділення, не достатньо для реалізації процесу, тому на цій ділянці запропоновано встановити центрифугу GEA Westfalia Separator, характеристика якої наведена вище, а креслення – у додатку.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						57
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.3 Опис технологічного процесу

3.3.1 Обґрунтування технології отримання метабіотика

Об'єктом роботи є метабіотик, отриманий на основі продуктів життєдіяльності біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій. Для обґрунтування вибору між роздільним і сумісним культивуванням біфідобактерій та пропіоновокислих бактерій для отримання метабіотика на основі їхніх метаболітів потрібно врахувати кілька ключових факторів: мету виробництва, біологічні особливості бактерій, їхню взаємодію, склад метаболітів, технологічні та економічні аспекти. Проаналізуємо всі ці фактори.

Переваги роздільного культивування:

1. Можливість контролю умов росту. Біфідобактерії і пропіоновокислі бактерії мають дещо різні оптимальні умови для росту. Біфідобактерії є анаеробами, які найкраще ростуть при рН 6,5–7,0, температурі 37–40 °С і в середовищі з вуглеводами, такими як лактулоза чи фруктоолігосахариди. Пропіоновокислі бактерії також анаеробні, але можуть бути більш стійкими до кисню (мікроаерофіли), віддають перевагу рН 5,0–6,5 і температурі 30–35°С, а також потребують джерел вуглецю, таких як лактати. Окреме культивування дозволяє оптимізувати ці параметри для кожного виду, максимізуючи їхню продуктивність.

2. Можливість отримання чистих метаболітів. При окремому культивуванні легше отримати чистий профіль метаболітів. Біфідобактерії продукують коротколанцюгові жирні кислоти (SCFA), такі як оцтова та молочна кислоти, а також деякі вітаміни (наприклад, В12). Пропіоновокислі бактерії синтезують пропіонову кислоту, вітамін В12, бактеріоцини, DHNA (біфідогенний фактор). Уникаючи конкуренції, можна отримати передбачуваний склад метаболітів, що важливо для стандартизації метабіотика.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						58
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3. Мінімізація конкуренції та антагонізму. При сумісному культивуванні може виникнути конкуренція за субстрати (наприклад, за вуглеводи чи лактати), а також можливе пригнічення росту одного виду іншим через продукування метаболітів (наприклад, пропіонова кислота може знижувати рН до рівня, несприятливого для біфідобактерій) [10, 12, 14].

Недоліки роздільного культивування:

1. Вищі витрати. Окреме культивування потребує двох паралельних процесів, що збільшує витрати на обладнання, середовища та енергію.

2. Складність отримання кінцевого продукту. Після культивування метаболіти потрібно ідентифікувати, виділяти та змішувати у визначених пропорціях, що може ускладнити технологічний процес через організацію додаткових стадій [10, 12, 14].

Переваги сумісного культивування:

1. Синергетичний ефект. Біфідобактерії можуть продукувати молочну кислоту, яка є субстратом для пропіоновокислих бактерій. Останні, у свою чергу, перетворюють молочну кислоту на пропіонову, що може підвищити загальний вихід метаболітів. Така взаємодія може сприяти створенню метабіотики з більш широким спектром біологічно активних речовин (SCFA, вітаміни, бактеріоцини). Окремо слід зазначити утворення пропіоновокислими бактеріями вторинного метаболіту - біфідогенної речовини 1,4-дигідроксі-2-нафтоїнової кислоти (1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid, DHNA).

2. Економія ресурсів. Один технологічний процес замість двох зменшує витрати на обладнання, стерилізацію, контроль параметрів і робочу силу.

3. Імітація природних умов. У природних екосистемах (наприклад, у кишківнику) ці бактерії часто співіснують і взаємодіють. Сумісне культивування може імітувати такі умови, що потенційно сприяє утворенню метаболітів, подібних до тих, що діють у людському організмі.

Недоліки сумісного культивування:

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

1. Складність оптимізації умов. Через різні оптимальні потреби бактерій (рН, температура, субстрати) важко знайти компромісні умови, які будуть ідеальними для обох видів. Наприклад, зниження рН пропіоновокислими бактеріями може пригнічувати ріст біфідобактерій.

2. Непередбачуваність складу метаболітів. Взаємодія може призводити до змін у профілі метаболітів, що ускладнює стандартизацію продукту. Наприклад, надлишок пропіонової кислоти може вплинути на співвідношення SCFA, що продукуються біфідобактеріями, або накопичення DHNA у високих концентраціях може впливати негативно на клітинні мембрани чи ферментативну активність.

3. Ризик виникнення конкуренції за поживні речовини між пропіоновокислими бактеріями і біфідобактеріями може обмежити доступ до субстратів, особливо якщо середовище не збалансоване (наприклад, недостатньо вуглеводів чи лактату) [10, 12, 14].

Отже, окреме культивування є кращим вибором, якщо метою є отримання стандартизованого метабіотику із чітко визначеним складом метаболітів (наприклад, для медичних цілей, де потрібна точна концентрація пропіонової кислоти чи вітаміну B12) та є потреба в максимальному контролі над кожним видом бактерій для забезпечення їхньої продуктивності. Тобто цей вид вирощування підходить, якщо виробник готовий інвестувати в паралельні процеси заради якості продукту.

Сумісне культивування доцільне, якщо метою є отримання метабіотику із синергетичним ефектом, що імітує природну взаємодію (наприклад, для загального оздоровлення кишківника). Так як нашою метою є отримання саме такого продукту, а також, враховуючи, що для вітчизняних виробників важливим є зниження витрат на виробництво, то доцільним є організувати технологію шляхом сумісного культивування бактерій.

Так як метою роботи є розробка технології отримання метабіотика, який містить суміш первинних та вторинних метаболітів біфідобактерій та

пропіоновокислих бактерій, то за основу обрана технологія сумісного культивування, але, враховуючи наведені вище фактори, обрано послідовне додавання мікрофлори – спочатку 24 год вирощуються біфідобактерії, потім додавання пропіоновокислих бактерій, які сумісно вирощуються ще 24 год до стаціонарної фази росту, на якій утворюються цінні вторинні метаболіти. Для уникнення пригнічення одного виду іншим протягом культивування необхідно постійно проводити моніторинг рН та склад метаболітів (молочної та пропіонової кислот та DHNA. Отриману культуральну рідину, що містить комплекс метаболітів, відправляють на відділення біомаси від культуральної рідини, а останню – на висушування. Останнє також має свої технологічні переваги, тому що отримання метабіотиків із сумішшю метаболітів не потребує організації стадій ідентифікації, виділення та очищення індивідуальних речовин метаболітів. Крім цього, суміш метаболів має широкий спектр позитивних властивостей на людину, які охарактеризовані у підрозділі 2.1.

3.3.2 Опис технологічного процесу отримання метабіотика

Стадія 1. Приготування ферментаційного середовища

Компоненти живильного середовища, розраховані на 1 серію у підрозділі 3.1, завантажують до реактору, вмикають мішалку, перемішують до повного розчинення, нагрівають вміст подачею пари до сорочки реактору, перемішують 15 хв. Стерилізацію проводять у цьому ж реакторі при температурі 115-120 °С 20 хв. Перед подачею на стадії техпроцесу охолоджують до температури 30-35 °С.

Стадія 2. Підготовка посівного матеріалу

У виробничій лабораторії проводять відновлення виробничих штамів *B. longum* та *P. shermanii*. Флакони із ліофілізованими культурами вскривають у асептичних умовах, до кожного флакона додають по 5 мл фізіологічного розчину, залишають на регідратацію на 10 хв. По 0,5 мл суспензії кожної культури засівають у пробірки із 9,5 мл середовища та вирощують у

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

термостатній кімнаті при 35 °С 24 год, отриману I генерацію кожної культури (по 3 пробірки) пересівають у колби, в кожній по 670 мл живильного середовища. Для отримання II генерації кожного штаму культури вирощують за тих самих умов.

Стадія 3. Вирощування інокуляту *B. longum*

До першого інокулятора на 20 л додають живильне середовище (13,3 л) та посівну культуру *B. longum* із однієї колби (0,7 л). Вирощування проводять 24 год при температурі 37–40 °С та контролі рН 6,5–7,0.

Стадія 4. Вирощування інокуляту *P. shermanii*

До другого інокулятора на 10 л додають живильне середовище (13,3 л) та посівну культуру *P. shermanii* із однієї колби (0,7 л). Вирощування проводять 24 год при температурі 30–35 °С та контролі рН 5,5–6,5.

Стадія 5. Виробниче культивування змішаної культури

До виробничого ферментера на 1000 л додають живильне середовище (532 л) та інокулят *B. longum* із першого інокулятора (14 л). Вирощують протягом 24 год при температурі 35 °С, після чого додають із другого інокулятора інокулят *P. shermanii* (14 л) та вирощують протягом 24 год при температурі 35 °С, контролюючи рН на рівні не нижче 6,5.

Стадія 6. Відділення культуральної рідини

Сумісну культуру *B. longum* та *P. shermanii* (560 л) перекачують до центрифуги, на якій відділяють культуральну рідину від біомаси при 10000 об/хв 10 хв. Біомасу клітин інактивують стерилізацією, а культуральну рідину направляють на пастеризацію.

Стадія 7. Інактивація культуральної рідини

Для остаточного видалення клітин бактерій проводять пастеризацію у пастеризаційній установці при температурі 70 °С протягом 30 хв.

Стадія 8. Наповнення та ліофілізація інактивованої культуральної рідини

Перед ліофілізацією до інактивованої культуральної рідини додають

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

стерильне сахарозо-желатиназне захисне середовище та розливають отриману масу у ПЕТ флакони, які направляють до ліофільної сушарки. Початкове заморожування проводять при температурі -12 °С 12 год. До камери подається вакуум, через 2 год поступово підвищують температуру до 37 °С, висушування відбувається протягом 8-8,5 год.

Стадія 9. Закупорювання флаконів

Флакони із ліофілізованим порошком подаються нагнітачем до автомативної лінії, на якій відбувається запаювання флаконів ковпачками.

Стадія 10. Пакування та маркування

На флакони наклеюють етикетку, разом із інструкцією по 10 шт пакують у коробки та відправляють на зберігання.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

3.4 Схеми виробництва

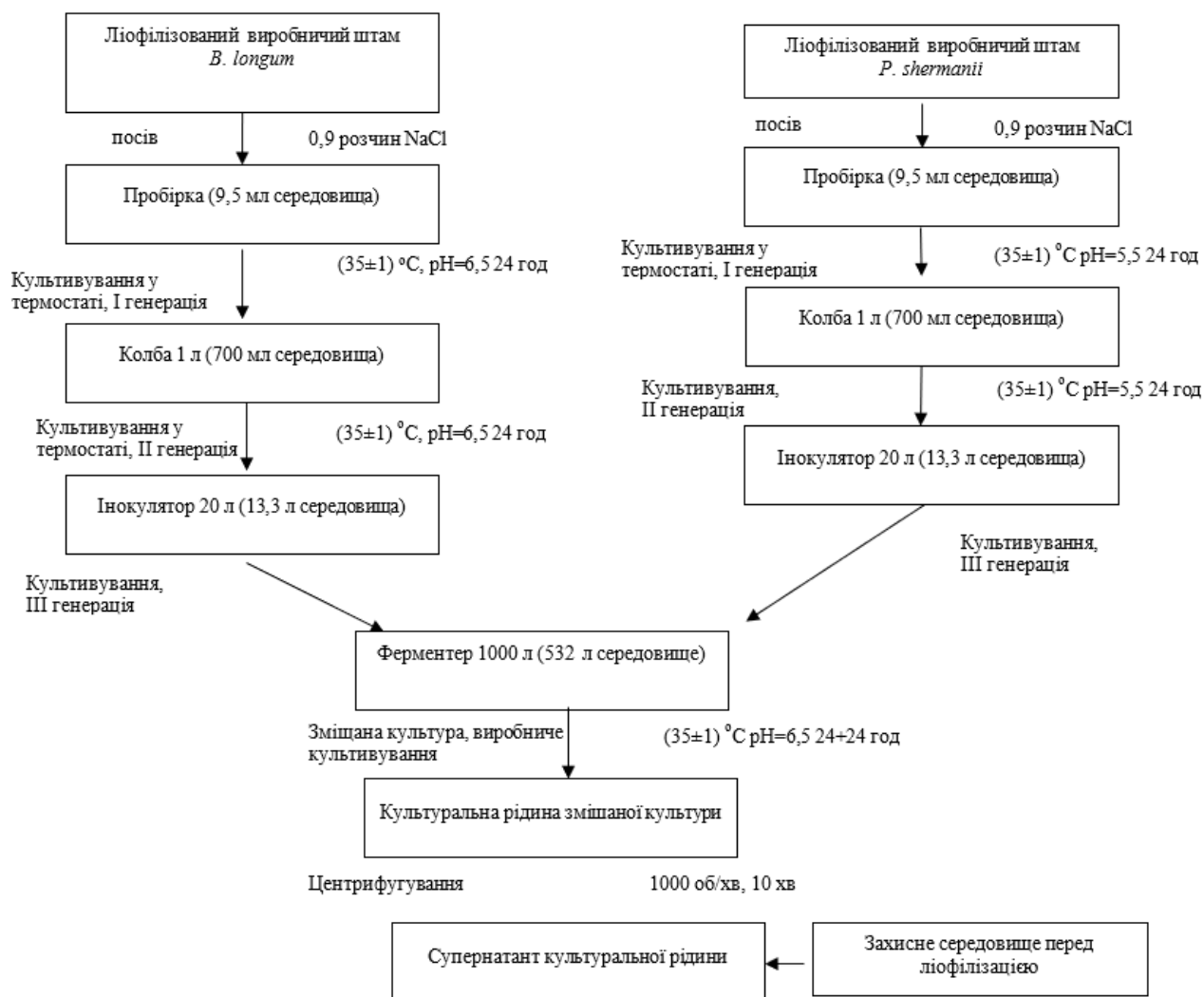


Рис. 3.1 – Біологічна схема виробництва метабіотика

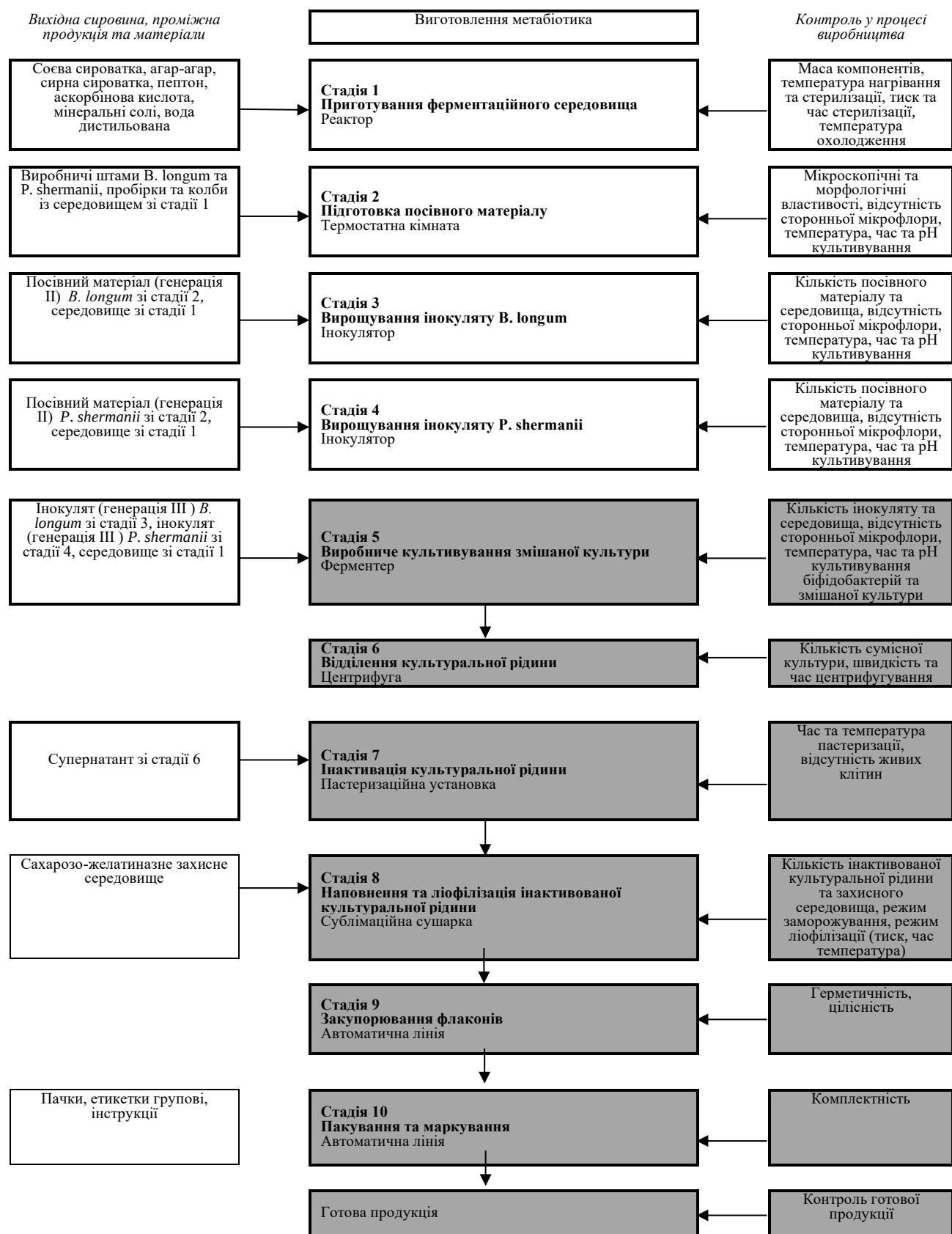


Рис. 3.2 – Технологічна схема виробництва метабіотика

3.5 Контроль виробництва

Критичні параметри виробництва наведено у табл. 3.3.

Таблиця 3.3 – Контроль критичних стадій і проміжної продукції

Номер	Критичні точки (критичні стадії, операції)	Критичні параметри і критичні характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності
1	2	3	4	5
K1.1-K1.8	Стадія 1. Приготування ферментаційного середовища	1. Кількість компонентів середовища 2. Однорідність 3. швидкість перемішування 4. час перемішування 5. час стерилізації 6. температура стерилізації 7. час охолодження 8. температура середовища після охолодження 9. стерильність	1. г 2. - 3. об/хв 4. хв 5. хв 6. °C 7. хв 8. °C 9. -	1. згідно з матбалансом 2. візуально, відсутність нерозчинених часток 3. 48 4. 15 5. 20 6. 115-120 7. 30-40 8. 30-35 9. стерильно
K2.1-K2.14	Стадія 2. Підготовка посівного матеріалу	1. властивості <i>B. longum</i> 2. властивості <i>P. shermanii</i> 3. кількість флаконів з ліофілізованою культурою <i>B. longum</i> 4. кількість флаконів з ліофілізованою культурою <i>P. shermanii</i> 5. кількість фізрозчину 6. час регенерації 7. кількість пробірок із середовищем 8. кількість середовища у пробірках 9. час вирощування культур у пробірках 10. температура вирощування у пробірках 11. кількість колб із середовищем 12. кількість середовища у колбах 13. час вирощування культур у колбах 14. температура вирощування	1. – 2. – 3. шт 4. шт 5. мл 6. хв 7. шт 8. мл 9. год 10. C 11. шт 12. л 13. год 14. C	1. грампозитивні палички 2. грампозитивні палички 3. 1 4. 1 5. 5 6. 10 7. 3 8. 9,5 9. 24 10. 35±1 11. 1 12. 13,3 13. 24 14. 35±1

		культур у колбах		
K3.1-3.5	Стадія 3. Вирощування інокуляту <i>B. longum</i>	1. чистота культури 2. кількість посівної культури 3. кількість середовища 4. час вирощування 5. температура вирощування 6. pH 7. кількість клітин	1. - 2. мл 3. л 4. год 5. С 6. од. 7. КУО/мл	1. однорідні препарати, грампозитивні палички, однорідні колонії при висіві 2. 700 3. 13,3 4. 24 5. (35±1) 6. 6,5 7. не менше 10 ⁸
K4.1-4.5	Стадія 4. Вирощування інокуляту <i>P. shermanii</i>	1. чистота культури 2. кількість посівної культури 3. кількість середовища 4. час вирощування 5. температура вирощування 6. pH 7. кількість клітин	1. - 2. мл 3. л 4. год 5. С 6. од. 7. КУО/мл	1. однорідні препарати, грампозитивні палички, однорідні колонії при висіві 2. 700 3. 13,3 4. 24 5. (35±1) 6. 5,5 7. не менше 10 ⁸
K5.1-5.9	Стадія 5. Виробниче культивування	1. кількість середовища 2. кількість інокуляту <i>B. longum</i> 3. час вирощування <i>B. longum</i> 4. температура вирощування <i>B. longum</i> 5. pH при вирощуванні <i>B. longum</i> 6. кількість інокуляту <i>P. shermanii</i> 7. час вирощування сумісної культури 8. температура вирощування сумісної культури 9. pH	1. л 2. л 3. год 4. С 5. од. 6. л 7. год 8. С 9. од.	1. 532 2. 14 3. 24 4. (35±1) 5. 6,5 6. 14 7. 24 8. (35±1) 9. 6,5
K6.1-6.4	Стадія 6. Відділення культуральної рідини	1. кількість сумісної культури 2. швидкість ротора 3. час 4. кількість супернатанта	1. л 2. об/хв 3. хв 4. л	1. 560 2. 10000 3. 10 4. 532
K7.1-7.5	Стадія 7. Інактивація культуральної рідини	1. кількість культуральної рідини 2. температура пастеризації 3. час пастеризації 4. кількість інактивованої культуральної рідини 5. стерильність	1. л 2. С 3. хв 4. л 5. -	1. 530 2. 70 3. 30 4. 525 5. стерильна

	Стадія 8. Наповнення та ліофілізація інактивованої культуральної рідини	1. кількість інактивованої рідини на розлив 2. кількість захисного середовища 3. кількість флаконів 4. наповнення 1 флакона 5. температура заморожування 6. час заморожування 7. вакуум 8. температура нагрівання 9. час нагрівання 10. залишкова вологість	1. л 2. л 3. тис. шт 4. мл 5. С 6. год 7. мм.рт.ст 8. С 9. год 10. %	1. 525 2. 26,25 3. 105 4. 5 5. -(12±1) 6. 12 7. 0,5-0,05 8. (37±1) 9. 12 10. 3
	Стадія 9. Закупорювання флаконів	1. кількість флаконів 2. кількість ковпачків	1. тис. шт 2. тис. шт	1. 105 2. 105
	Стадія 10. Пакування та маркування	1. правильність етикетування 2. комплектність пачок	1. – 2. тис. шт	1. відповідно до макету 2. 10,5

3.6 Екологічні аспекти виробництва

Виробництво метаболітного пробіотику на основі *Bifidobacterium longum* та *Propionibacterium shermanii* включає ряд екологічних аспектів, які слід враховувати для зниження можливого негативного впливу на навколишнє середовище, таких як: 1. використання сировини органічної природи, 2. споживання енергії, 3. утворення відходів (біомаси, стічних вод), а також 4. потенційні викиди парникових газів. Заходи щодо зниження впливу на екосистеми включають оптимізацію ресурсів, переробку відходів, використання енергоефективного обладнання та дотримання стандартів GMP для мінімізації забруднення.

Виробництво метаболітного пробіотику включає кілька стадій: приготування ферментаційного середовища, культивування бактерій, центрифугування, пастеризацію, ліофілізацію, укупорку та пакування. Кожна стадія має потенційні екологічні впливи, такі як споживання ресурсів, утворення відходів, енергоспоживання та викиди. Для забезпечення сталого виробництва необхідно оцінити ці аспекти та впровадити заходи для зниження

впливу на довкілля.

Проаналізуємо ці групи потенційних ризиків.

1. Використання сировини

Ферментаційне середовище містить соєву сироватку (3%), сирну сироватку (0,1%), пептон (0,1%), агар-агар (0,25%), солі (натрій лимоннокислий, калій фосфорнокислий, магній сірчанонокислий), аскорбінову кислоту та дистильовану воду. Захисне середовище для ліофілізації включає сахарозу (50%), желатин (25%) і молоко (25%).

Соєва та сирна сироватки: Виробництво сироваток пов'язане з сільськогосподарською діяльністю (виращування сої, молочне виробництво), що може спричиняти деградацію земель, використання води та пестицидів. Наприклад, соєве виробництво може мати значний вуглецевий слід через транспортування та обробку. Пептон і желатин: Виробляються з тваринної сировини (яловичина, свинина), що пов'язане з викидами метану та споживанням ресурсів у тваринництві. Сахароза: Виробництво цукру з буряків чи тростини потребує значних обсягів води та енергії, а також може спричиняти деградацію ґрунтів. Дистильована вода: Виробництво дистильованої води є енергоємним через процеси зворотного осмосу або дистиляції.

Заходи зниження впливу: використання локальних джерел сироватки (від українських молочних чи соєвих підприємств) для зменшення транспортних викидів; застосування сертифікованої сировини з екологічно чистих джерел (наприклад, органічної сої чи молока); оптимізація складу середовища для зниження частки пептону та желатину, можливо, заміна рослинними аналогами (наприклад, соєвий пептон); повторне використання відходів виробництва.

2. Енергоспоживання

Виробничий процес включає енергоємні операції, такі як нагрівання реакторів (115–120 °C для стерилізації), охолодження (до 30–35 °C),

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

центрифугування (10000 об/хв), пастеризація (70 °С), ліофілізація (заморожування до -12 °С, нагрів до 37 °С).

Енергоспоживання сприяє викидам CO₂, якщо електроенергія надходить із викопних джерел. Наприклад, ферментери (Sartorius Biostat, 5–10 кВт) і ліофільні сушарки (GEA Lyovac, 20–30 кВт) є основними споживачами енергії. Охолодження та нагрівання потребують значних обсягів електроенергії або пари, що може підвищувати вуглецевий слід.

Заходи зниження впливу: використання енергоефективного обладнання з рекуперацією тепла (наприклад, пластинчасті теплообмінники для пастеризації); впровадження відновлюваних джерел енергії (сонячні панелі, вітрова енергія) на ТОВ "БІОЛІК ФАРМА"; оптимізація режимів роботи обладнання; використання автоматизованих систем управління (PLC) для точного контролю енергоспоживання.

3. Утворення відходів

Основні відходи включають: біомаса (10% від 560 л культуральної рідини, близько 55 л), яка видалється після центрифугування та стерилізується; стічні води від систем очищення (CIP) та промивання обладнання; упаковка (залишки ПЕТ-флаконів, картон, пластик).

Біомаса може бути джерелом органічного забруднення, якщо не переробляється. Стічні води містять хімічні реагенти (NaOH, HCl для CIP) та органічні сполуки (залишки сироватки, метаболіти), які потребують очищення перед скиданням. Пластикова упаковка сприяє накопиченню твердих відходів, якщо не переробляється.

Заходи зниження впливу: переробка біомаси - стерилізовану біомасу можна використовувати як органічне добриво в сільському господарстві або як сировину для біогазу або організувати безвідходне виробництво та організувати виробництво пробіотика на основі цих видів бактерій; очищення стічних вод - впровадження систем біологічного очищення (аеробні/анаеробні реактори) для видалення органічних сполук перед скиданням; мінімізація

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

хімікатів - використання екологічно безпечних реагентів для СІР (наприклад, біорозкладних миючих засобів); переробка упаковки - використання ПЕТ-флаконів із вторинної сировини та організація системи повернення упаковки для переробки.

4. Викиди парникових газів

Виробництво пробіотика, зокрема енергоспоживання та транспортування сировини, сприяє викидам CO₂ та інших парникових газів.

Енергоємні процеси (ферментація, ліофілізація) мають значний вуглецевий слід, якщо електроенергія надходить із вугільних чи газових електростанцій. Транспортування сировини (сої, молока, цукру) додає викиди, особливо якщо сировина імпортується.

Заходи зниження впливу: перехід на відновлювані джерела енергії (наприклад, сонячні панелі для живлення ліофільних сушарок); локалізація постачання сировини для зменшення транспортних викидів; впровадження вуглецево-нейтральних практик, таких як компенсація викидів через висадження дерев або участь у програмах carbon offset.

5. Вплив на водні ресурси

Виробництво дистильованої води та очищення обладнання потребують значних обсягів води.

Виробництво дистильованої води (95,63% ферментаційного середовища) є енергоємним і може виснажувати водні ресурси. Стічні води від СІР можуть забруднювати водойми, якщо не обробляються належним чином.

Заходи зниження впливу: використання систем рециркуляції води для зменшення споживання; впровадження зворотного осмосу з високою ефективністю для виробництва дистильованої води; очищення стічних вод до рівня, безпечного для скидання, відповідно до екологічних стандартів України.

Впровадження запропонованих заходів забезпечує: відповідність виробництва стандартам ISO 14001 (екологічний менеджмент) та українським

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						72
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

нормам щодо захисту довкілля; зниження витрат - переробка відходів (біомаса, стічні води) та використання енергоефективного обладнання знижують операційні витрати; репутаційні переваги - екологічно стале виробництво підвищує привабливість продукту для споживачів, які цінують екологічність, та сприяє виходу на міжнародні ринки; довгострокова сталість - заходи, такі як використання відновлюваних джерел енергії та локальної сировини, сприяють сталому розвитку підприємства та знижують його залежність від імпорту.

Таким чином, екологічні аспекти виробництва метаболітного пробіотика включають використання сировини, енергоспоживання, утворення відходів, викиди парникових газів і вплив на водні ресурси. Запропоновані заходи, такі як локалізація сировини, переробка біомаси, використання енергоефективного обладнання та очищення стічних вод, дозволяють значно знизити вплив на екосистеми. Ці заходи не лише забезпечують відповідність екологічним стандартам, але й підвищують економічну ефективність і репутацію ТОВ "БІОЛІК ФАРМА", сприяючи сталому розвитку біотехнологічної галузі.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						73
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВОК

1. Сучасні тенденції вказують на зростання попиту на метабіотики через їхні переваги на здоров'я та можливість спрощеного виробництва без виділення окремих речовин. Проведений аналіз сучасних технологій виробництва метабіотиків показав, що комбінація *B. longum* та *P. shermanii* є перспективною завдяки синергічним ефектам їхніх метаболітів, таких як молочна кислота, пропіонова кислота, DHNA та кон'югована лінолева кислота (CLA). Ці метаболіти мають імуномодулюючі, антиатеросклеротичні та антидіабетичні властивості, що підтверджується літературними даними.

2. Розроблена технологія включає десять стадій: приготування ферментаційного середовища, підготовка посівного матеріалу, вирощування інокулятів *B. longum* та *P. shermanii*, виробниче культивування змішаної культури, відділення культуральної рідини, інактивація, ліофілізація, закупорка, пакування та маркування. Ключовою особливістю є послідовне культивування (24 години для *B. longum*, потім 24 години зі *P. shermanii*) для максимального накопичення вторинних метаболітів у стаціонарній фазі росту. Постійний моніторинг pH (6,5–7,0) та складу метаболітів забезпечує стабільність процесу та уникає пригнічення однієї культури іншою.

3. Вибрано обладнання, що відповідає стандартам GMP, включаючи ферментери, декантерну центрифугу, пастеризаційну установку, ліофільну сушарку та автоматизовані лінії для герметизації й пакування. Технічні параметри (температура 115–120 °C для стерилізації, 10000 об/хв для центрифугування, -12 °C для ліофілізації) забезпечують високу якість продукту та ефективність процесу. Обладнання відповідає промислому масштабу та мінімізує втрати.

4. Біологічна схема включає послідовне культивування *B. longum* та *P. shermanii* з контролем метаболітів. Технологічна схема охоплює всі стадії від підготовки середовища до пакування, із чіткими параметрами. Апаратурна

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

схема деталізує обладнання для кожної стадії, забезпечуючи інтеграцію в єдиний виробничий цикл на ТОВ "БІОЛІК ФАРМА".

5. Виробництво пов'язане з використанням сировини (соя, молоко, пептон тощо), енергоємними процесами (ферментація, ліофілізація), утворенням відходів (біомаса, стічні води) та викидами CO₂. Запропоновано заходи: локалізація сировини для зменшення транспортних викидів, переробка біомаси в добрива або біогаз або організація безвідходного виробництва з організацією пробіотика; використання енергоефективного обладнання та відновлюваних джерел енергії; очищення стічних вод біологічними методами та рециркуляція води; вторинна переробка ПЕТ-флаконів і упаковки. Ці заходи знижують вуглецевий слід, забруднення та виснаження ресурсів, відповідаючи стандартам ISO 14001.

Розроблена технологія дозволяє ТОВ "БІОЛІК ФАРМА" впровадити виробництво інноваційного метабіотика, який має ринковий потенціал завдяки фізіологічним властивостям метаболітам обраних видів мікроорганізмів на здоров'я людини. Економічна ефективність, відповідність стандартам GMP та екологічна сталість забезпечують конкурентні переваги та можливість експорту. Робота також сприяє розвитку біотехнологічної галузі в Україні, пропонуючи модель для інших пробіотичних продуктів.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
						75
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Безвідходна біотехнологія отримання симбіотики і метабіотики на основі *Bifidobacterium longum* – Я 3 та *Propionibacterium shermanii* – 4 / Л. О. Крупицька та ін. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького*. 2018. Т. 20, № 85. С. 148–154. DOI: 10.15421/nvlvet8527.

2. Державна Фармакопея України : в 3–х т. Доповнення 5 / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2021. 424 с.

3. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: <http://www.drlz.com.ua/> (дата звернення: 10.11.2024).

4. Екологічна біотехнологія : навч. посіб. : у 2 кн. / О. В. Швед та ін. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2018. Т. 1. 424 с.

5. Крупицька Л. О. Розробка технології синбіотичних біологічно активних добавок : дис. ... канд. техн. наук : 03.00.20 – біотехнологія (технічні науки). Одеса, 2018. 257 с.

6. Ліки контроль. URL: <https://likicontrol.com.ua/> (дата звернення: 10.11.2024).

7. Мікробіологія : підручник / М. Г. Сергійчук та ін. Київ : Київ. ун-т, 2008. 541 с.

8. Милославський Д. К. Пробиотики: від Іллі Мечникова до сьогодення. *Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини*. 2020. № 2. С. 109–115. URL: http://www.internalmed-journal.in.ua/wp-content/uploads/2020/11/%D0%96%D1%83%D1%80%D0%BD%D0%B0%D0%BB_2_2020-109-115 (дата звернення: 20.02.2025).

9. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник. 2–ге вид., допов. і перероб. Київ : НУХТ, 2010. 632 с.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

10. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. І. Ферментація. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 240 с.

11. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 296 с.

12. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. III. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 252 с.

13. Соломон А. М., Казмірук Н. М., Тузова С. Д. Мікробіологія харчових виробництв : навч. посіб. для ВНЗ. Вінниця : РВВ ВНАУ, 2020. 312 с.

14. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ-2000, 2018. 410 с.

15. Технологія пробіотиків : підручник / С. О. Старовойтова та ін. Київ : НУХТ, 2012. 318 с.

16. Хижняк О. С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату : дис. ... канд. фармацевт. наук : 15.00.01 / НФаУ. Харків : НФаУ, 2016. 203 с.

17. Чухрай І. Л. Оптимізація фармацевтичного забезпечення пробіотиками : дис. ... канд. фармацевт. наук : 15.00.01 / Львівський нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького. Львів, 2021. 245 с.

18. Advances and challenges in interaction between heteroglycans and Bifidobacterium: Utilization strategies, intestinal health and future perspectives / Li Long-Qing et al. *Trends in Food Science Technology*. 2023. Vol. 134. P. 112–122. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.02.018.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

19. Biswas I., Mohapatra Pradeep K. Das. Recent advancement in metabiotics: A consortium with bioactive molecules after fermentation by probiotic bacteria with multidisciplinary application potential and future solution in health sector. *Bioresource Technology Reports*. 2023. Vol. 23. P. 101583. DOI: 10.1016/j.biteb.2023.101583.

20. Bücher C., Burtscher J., Domig K. J. Propionic acid bacteria in the food industry: An update on essential traits and detection methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021. Vol. 20(5). DOI: 10.1111/1541-4337.12804.

21. Class Names and the International Numbering System for Food Additives, CAC/GL 36-1989, in 1989, Revision 2008. Last Amendment 2011. Published by Codex Alimentarius. URL: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius> (Date of access: 24.04.2025).

22. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou / F. Nehal et al. *Microb. Pathog.* 2019. Vol. 132. P. 10–19.

23. Chen J., Chen X., Loong Ho C. Recent Development of Probiotic Bifidobacteria for Treating Human Diseases. *Front Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 9. P. 770248. DOI: 10.3389/fbioe.2021.770248.

24. Colonic Microbiota, Nutrition and Health. Chapter 11. The molecular biology of Bifidobacteria / ed.: R. Glenn, B. R. Marcel. Springer : Dordrecht, 1999. 304 p.

25. Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <https://www.fao.org/home/en> (Date of access: 01.02.2025).

26. Growth characterization of *Propionibacterium* and propionic acid production capabilities at different temperatures and pH levels / J. K. Chae et al. *Food Sci Biotechnol.* 2022. Vol. 31(3). P. 357–364. DOI: 10.1007/s10068-022-01038-7.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

27. Imlay J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. Vol. 11. P. 443–454.

28. Jang H. J., Na-Kyoung L., Hyun-Dong P. A Narrative Review on the Advance of Probiotics to Metabiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2024. Vol. 34(3). P. 487–494. DOI: 10.4014/jmb.2311.11023.

29. Korcz E., Varga L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 2021. Vol. 110. P. 375–384.

30. Krupytska L., Kaprelyants L., Trufkti L. Investigation of the antagonistic activity of secondary metabolites of propionic acid bacteria. *Food Science and Technology.* 2017. Vol. 11(2). P. 16–20. DOI: 10.15673/fst.v11i2.508.

31. Lactic acid bacteria and Bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods / D. M. Linares et al. *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. P. 846. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00846.

32. Lactic Acid Fermentation in the Food Industry and Bio-Preservation of Food / Y. L. Aguirre-Garcia et al. *Fermentation.* 2024. Vol. 10. P. 168.

33. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties / Y. Zhao et al. *Journal of Functional Foods.* 2019. Vol. 56. P. 21–32. DOI: 10.1016/j.jff.2019.02.044.

34. Probiotics / Food and Agriculture Organization of the United Nations. URL: <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/> (Date of access: 01.02.2025).

35. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries / A. Latif et al. *Front Microbiol.* 2023. Vol. 14. P. 1216674. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1216674.

36. *Propionibacterium freudenreichii* component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by

modulation of bacterial flora and lymphocyte homing / Y. Okada et al. *Gut*. 2006. Vol. 55(5). P. 681–688. DOI: 10.1136/gut.2005.070490.

37. Propionic Acid Fermentation—Study of Substrates, Strains, and Antimicrobial Properties / U. Antone et al. *Fermentation*. 2023. Vol. 9(1). P. 26. DOI: 10.3390/fermentation9010026.

38. Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli / M. S. R. Rajoka et al. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2019. Vol. 11. P. 1132–1142.

39. Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries / T. Raj et al. *Syst. Microbiol. Biomanuf.* 2022. Vol. 2. P. 14–40.

40. Shibamoto T. Diacetyl: Occurrence, Analysis, and Toxicity. *J. Agric. Food Chem.* 2014. Vol. 62. P. 4048–4053.

41. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health / E. E. Blaak et al. *Benef Microbes*. 2020. Vol. 11(5). P. 411–455. DOI: 10.3920/BM2020.0057.

42. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria / K. Papadimitriou et al. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016. Vol. 80(3). P. 837–890.

43. Technology of producing symbiotic biologically active additive / L. Krupytska et al. *Food Science and Technology*. 2018. Vol. 12(2). DOI: 10.15673/fst.v12i2.930.

44. Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of Food / B. Sionek et al. *Fermentation*. 2023. Vol. 9(12). P. 1019.

45. The Role of Microorganisms and Their Antibacterial Compounds in Food Biopreservation / B. Sionek et al. *Appl. Sci.* 2024. Vol. 14(13). P. 5557. DOI: 10.3390/app14135557.

					162.02.12.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

ДОДАТКИ



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ



НАЦІОНАЛЬНИЙ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

СЕРТИФІКАТ

учасника
№355

Цим засвідчується, що

Петрашенко А. О.

брав(ла) участь у роботі V Міжнародної
науково-практичної конференції

**«ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ
СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ»**

(тривалість - 8 год)

28 березня 2025 р., м. Харків, Україна

В.о. ректора НФаУ,
д. фарм. н., проф.

Проректор з ННР,
д. фарм. н., проф.

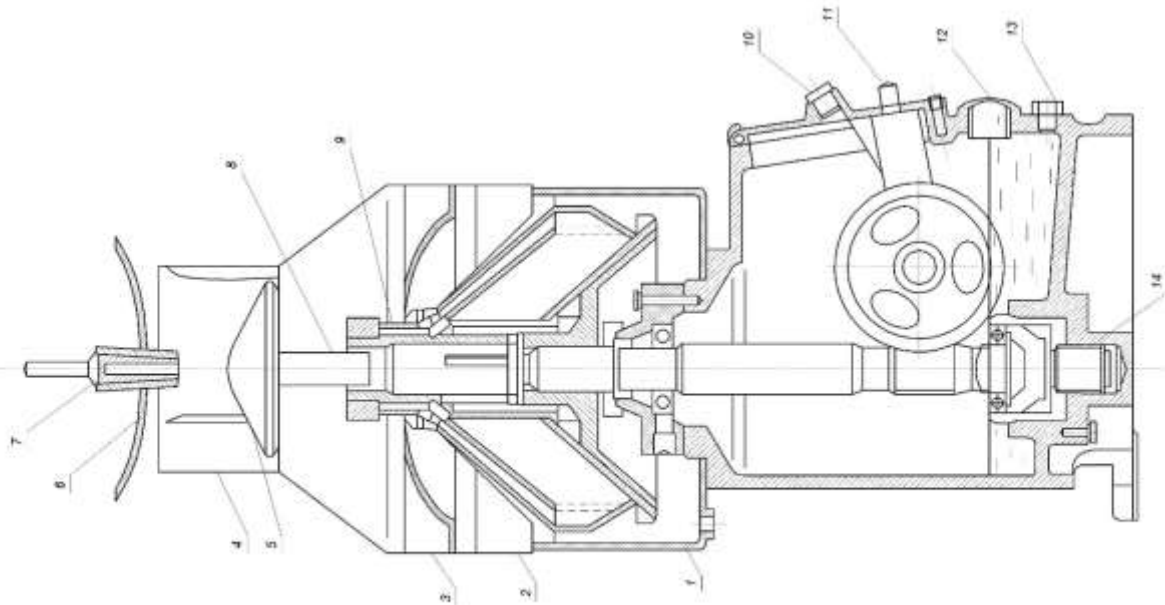
Завідувачка кафедри
біотехнології НФаУ,
д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Наталя ХОХЛЕНКОВА



Эле	Позиция	Наименование	Класс	Примечание
1	1	Чаще стальные	1	
2	2	Резиновые камеры	2	
3	3	Резиновые камеры	3	
4	4	Резиновые камеры	4	
5	5	Резиновые камеры	5	
6	6	Резиновые камеры	6	
7	7	Резиновые камеры	7	
8	8	Резиновые камеры	8	
9	9	Резиновые камеры	9	
10	10	Резиновые камеры	10	
11	11	Резиновые камеры	11	
12	12	Резиновые камеры	12	
13	13	Резиновые камеры	13	
14	14	Резиновые камеры	14	
15	15	Резиновые камеры	15	

162.02.12.00.000.B3	Центрифуга	Акт приема-передачи	1.10
162.02.12.00.000.B3	Валок лановый	Акт приема-передачи	1
162.02.12.00.000.B3	МОНВ	Акт приема-передачи	57
162.02.12.00.000.B3	Амортизация	Акт приема-передачи	37