

**СТРИЛЕЦЬ Оксана Петрівна**

д-р фарм. наук, професор,
Національний фармацевтичний університет
ORCID ID: 0000-0003-0846-8663

СТРЕЛЬНИКОВ Леонід Семенович

д-р фарм. наук, професор,
Національний фармацевтичний університет
ORCID ID: 0000-0002-0883-470X
Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ З ПИТАНЬ ОПТИМІЗАЦІЇ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Організація біотехнологічного процесу починається з комплексного вивчення біооб'єкту, а метою даного процесу є забезпечення накопичення в поживному середовищі кінцевого продукту. Біотехнологічне управління процесом повинно бути направлено на забезпечення оптимальних умов для росту та розвитку мікроорганізму – штаму-продуценту. Ефективність біовиробництва на першому етапі отримання біомаси залежить від наступних факторів: оптимальних параметрів навколишнього середовища і контролю за їх зміною; оптимальності поживного середовища; варіанта метода культивування мікроорганізмів, які забезпечують максимальне накопичення біомаси в поживному середовищі, раціонального вибору біореактора.

Lactobacillus - це великий рід молочнокислих бактерій, який налічує близько 50 видів паличкоподібних мікроорганізмів, серед яких одне із головних посідає *Lactobacillus acidophilus*. Під *Lactobacillus* належить до відділу *Firmicutes*, класу *Bacilli*, ряду *Lactobacillales*, родини *Lactobacillaceae*. Питання номенклатури і таксономії бактерій роду *Lactobacillus* до теперішнього часу остаточно не вирішені і переглядаються. Слід зазначити, що в даний час рід об'єднує понад 100 видів і представляє найбільшу групу в порядку *Lactobacillales*¹.

¹ De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.-H., & Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes*. New York: Springer.

Ацидофільні бактерії за останні роки широко користуються попитом серед виробників пробіотиків та виробничих заквасок. Лактобактерії є важливою складовою мікрофлори кишківника людини. Вони відіграють ключову фізіологічну роль у функціонуванні мікроекологічної системи людей².

Лікувальний ефект препаратів, які містять лактобацили, обумовлений антагоністичною дією лактобактерій по відношенню до умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, включаючи стафілококи, ентеропатогенні кишкові палички, протей, шигели, що визначає корегуючу дію препарату при порушеннях бактеріоценозу. Також антагоністичну активність лактобактерій пов'язують з дією неспецифічних (органічні кислоти, низький окисно-відновний потенціал) та специфічних (антибіотики та бактеріоцини) факторів. Препарати лактобактерій покращують обмінні процеси, перешкоджають формуванню затяжних форм кишкових захворювань, підвищують неспецифічну резистентність організму³.

Водночас постійно проводяться роботи з пошуку альтернативних видів поживних середовищ, які дозволяють не тільки інтенсифікувати процес виробництва пробіотичних препаратів і заквасок на стадії накопичення культури, а й зменшити фінансові витрати на виробництво⁴.

На кафедрі біотехнології Національного фармацевтичного університету (НФаУ) розроблено експериментальний склад поживного середовища для культивування *Lactobacillus acidophilus* під умовною назвою "СТС", що містить сироватку підсирну молочну, екстракт топінамбура та препарат водоростей – спіруліни. У попередніх дослідженнях доведено ефективність розробленого поживного середовища, але відомо, що на динаміку накопичення біомаси бактерій та їх фізіологічну активність впливають не тільки якісний та кількісний склад поживного середовища, а й умови культивування (рН середовища, температура та час культивування)⁵. Тільки за умови сукупної дії оптимальних значень вищезазначених параметрів стає можливим отримання достатньої кількості біомаси з певним рівнем фізіологічної активності⁶.

2 Jankovskij D.S., & Dyment G.S. (2006). Bifidobakterii i laktobacilly kak optimal'naja osnova sovremennyh probiotikov. *Sovremennaja pediatrija*, 3, 3-12.

3 Voloshyna I.M., Shkotova L.V., Skorokhod S.O., Appolonova I.Ie., & Zholobak N.M. (2019). Bakterii rodu *Lactobacillus*: bioliichni ta likuvalni vlastyosti. *Mikrobiol. zhurn.*, 81(6), 3-15.

4 Raskoshnaja T.A., & Semeniha V.F. (2010). Pitatel'nye sredy dlja kul'tivirovanija acidofil'noj molochnokisloj palochki. *Molochnaja promyshlennost'*, 11, 39-41.

5 Zavhorodnii A. I., & Huzhynska S. O. (2016). Udoskonalennia tekhnolohii kultyvuvannia laktobakterii ta bifidobakterii. *Veterynarna medytsyna*, 102, 244-246.

6 Azyzpur Kh., & Shynkarenko L. M. (2004). Vliyanye tekhnolohicheskikh parametrov kultivirovaniya na rost y lyzyruemost L. delbrueckii subsp. bulgaricus 51. *Ahroekolohichnyi zhurnal*, 4, 54-62.

Саме тому мета даної роботи – дослідження з оптимізації умов культивування *Lactobacillus acidophilus* на поживному середовищі експериментального складу є актуальною.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у теоретичному та експериментальному обґрунтованні параметрів ведення технологічного процесу культивування *Lactobacillus acidophilus* на поживному середовищі із сироваткою, екстрактом топінамбура, спіруліною (СТС), що в подальшому можливо застосовувати з метою накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* для отримання біотехнологічних продуктів.

Об'єктом дослідження була обрана накопичувальна культура *Lactobacillus acidophilus*, та поживне середовище експериментального складу СТС.

Культура *Lactobacillus acidophilus* є лідером по застосуванню серед пробіотичних мікроорганізмів. Переважна кількість сучасних пробіотичних препаратів і продуктів у своєму складі містить штами ацидофільної палички. За морфологічними ознаками, це дрібні нерухомі палички, розташовані поодинокі. Не утворюють спор, мають правильну форму. Оптимальна температура росту (30–40) °С. Добре ростуть на агарі з дріжджовим екстрактом, знежиреним молоком, поживному середовище MRS. Є грампозитивними факультативними анаеробами. Колонії опуклі, спігментовані, рівні. Активно засвоюють лактозу, галактозу, мальтозу, манозу. Метаболізм бродильного типу⁷.

Експериментальне поживне середовище СТС – це середовище, розроблене на кафедрі біотехнології НФаУ та призначене для культивування ацидофільної палички. До складу поживного середовища входять вода очищена, екстракт топінамбура, сироватка підсирна молочна, спіруліна. Крім того у процесі виконання експериментальних досліджень застосовували поживні середовища: MRS-1 (підке), MRS-5 (щільне), м'ясо-пептонний агар (МПА), агар Сабура.

Приготування експериментального поживного середовища СТС проводили наступним чином: клубні топінамбуру ретельно промивали у проточній водопровідній воді, очищували та розрізали на рівні шматочки (1–3 см). Після цього заповнювали ними скляну ємкість та додавали воду очищену. Отриману суміш нагрівали та витримували певний час. Після охолодження екстракт фільтрували крізь подвійний марлевий фільтр та розводили водою очищеною. Далі до сироватки молочної підсирної дода-

⁷ Беспоместных К.В. (2011). Исследование биохимических, морфологических и свойства штаммов бактерий рода *Lactobacillus*. Техника і технологія пшхевых производств, 2, 11–15.

вали розведений екстракт топінамбуру та порошок сипучого препарату спіруліни. Ретельно перемішували, розливали у флакони, закривали ватяно-марлевими пробками та кавпачками, стерилізували при температурі (121 ± 2 °C) та тиску 1,1 атм протягом 20 хв.

Отримане експериментальне поживне середовище СТС застосовували для накопичення ацидофільної палички, рН середовища корегували за допомогою розчину кислоти молочної, натрію гідроокису.

При проведенні досліджень використовували класичні біологічні методи та технологічні прийоми біотехнологічних експериментів, застосовували мікроскопічні, культуральні методи досліджень, які проводили за загальноприйнятими в біотехнології методиками.

Для визначення концентрації біомаси мікроорганізмів застосовували метод бактоцентрифугування. Кількість життєздатних клітин мікроорганізмів визначали використовуючи метод серійних послідовних розведень з наступним посівом на щільне поживне середовище (метод Коха)⁸.

Аналіз результатів експериментальних досліджень виконували згідно Державної Фармакопеї України (ДФУ). Дані фізико-хімічних і біологічних досліджень обробляли методами варіаційної статистики. Відмінності між групами вважали вірогідними при прийнятому рівні статистичної значущості $p \leq 0,05$ ⁹.

При визначенні антагоністичної активності супернатантів *Lactobacillus acidophilus* культуру штама-продуцента культивували на поживному середовищі експериментального складу при температурі (37 ± 2) °C протягом 48 год. Після чого культуральну рідину центрифугували на центрифугу ПН-8 при 6000 об/хв протягом 15 хв, декантували рідину та аналізували антимікробну активність методом дифузії в агар (ДФУ). Як тест-мікроорганізми застосовували тест-культури: грампозитивні бактерії (*Staphylococcus aureus* ATCC 6533), грампозитивні спорові палички (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), грамнегативні палички (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739) та дріжджові гриби (*Candida albicans* ATCC 10231).

Для оптимізації процесу культивування ацидофільної палички застосовували пакет програмного забезпечення – статистичну графічну систему StaGraphics Plus for Windows¹⁰.

8 Pyroh T. P., & Ihnatova O. A. (2009). Zahalna biotekhnolohiia. Kyiv : NUKhT.

9 Derzhava Farmakopeia Ukrainy (2011). Kh. : Derzh. p-vo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv».

10 Djuk V. (1997). Obrabotka danih na PK v primerah. SPb. : Piter.

На першому етапі експериментальних досліджень визначали вплив часу культивування на накопичення біомаси ацидофільної палички на поживному середовищі СТС. Для цього у стерильні колби об'ємом 500 мл вносили стерильне рідке поживне середовище СТС, приготовлене заздалегідь, та посівний матеріал *Lactobacillus acidophilus*, тобто суспензію мікроорганізмів у концентрації $1 \cdot 10^7$ колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл. Розміщали колби у термостаті ТСО-80 та культивували протягом 7 діб (168 год) при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через певний проміжок часу відбирали пробу 20 мл та визначали кількість біомаси (г/л) методом бактоцентрифугування в перерахунку на 1 л культуральної рідини. Результати досліджень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1.

**Результати накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus*
на поживному середовищі СТС**

Показник	Тривалість культивування, год								
	12	18	24	36	48	60	72	126	168
Кількість біомаси, г/л	0,7	5	52	59	68	70	76	88	82

Результати проведеного дослідження показали (табл. 1), що у період з моменту початку ферментації і до 24 год відбувається різке збільшення кількості біомаси ацидофільної палички, після чого залишається практично на одному рівні, а після 126 годин культивування кількість біомаси починає зменшуватися, що вірогідно обумовлено початком автолітичних процесів.

Таким чином можна зробити висновок, що максимальний термін ферментації *Lactobacillus acidophilus* на поживному середовищі СТС становить 126 год, а мінімальний – 18 год.

За даними літератури було встановлено, що екологічні фактори (характер субстрату, активна кислотність середовища, наявність молочної кислоти тощо) впливають на антимікробні властивості молочнокислих бактерій¹¹. Тому на другому етапі експериментальних досліджень було проведено вивчення впливу рН поживного середовища СТС на антимікробні властивості супернатантів, отриманих методом центрифугування культуральної рідини при 6000 об/хв протягом 20 хв після культивування *Lactobacillus acidophilus* при температурі $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ протягом 36 год в термостаті ТСО-80.

¹¹ Karapetjan K. Dzh., Akopjan A. S., Thruni F. N., & Balabekjan C. R. (2008). Vlijanie sostava pitatel'noj sredy na projavlenie antimikrobnih svojstv nekotoryh molochokislyh bakterij. Uchenye zapiski Erevanskogo gosudarstvennogo uiversiteta. Estestvennye nauki, 3, 125-130.

Тривалість і умови культивування обрано за даними наукової літератури. Зміни рН поживного середовища корегували розчинами кислоти молочної (40 %) та натрію гідроксиду (10 %) у межах від 3 до 10 одиниць.

Антимікробну активність визначали методом "колодязів". В якості тест-штамів використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231. Для підтвердження чистоти використаних культур попередньо готували фіксовані препарати мікроорганізмів ті фарбували їх відповідними методами. Експериментально підтверджено, що мікроскопічна картина використаних мікроорганізмів відповідає морфологічним ознакам обраних тест-культур.

Ступінь антимікробної активності бактеріоцинів, що містяться у супернататах *Lactobacillus acidophilus* визначили за величиною зони затримки росту навколо лунки, куди вносили відповідний супернантант. Результати проведеного дослідження представлено в табл. 2.

За результатами дослідження впливу рН на антимікробну активність *Lactobacillus acidophilus*, які представлено в табл. 2 видно, що при культивуванні *Lactobacillus acidophilus* на поживному середовищі експериментального складу СТС, супернантанти проявляють помірну антимікробну активність проти обраних тест-мікроорганізмів, при чому найбільшого рівня досягає пригнічуюча дія при рН 4,0–5,0, потім вона поступово знижується і майже зникає при рН 10,0.

Крім того, було відмічено, що при рН 3,0 через 48 год інкубування у колбах візуально була значно менша густина культуральної рідини, що, в свою чергу може свідчити про низьку кількість біомаси, що утворилася при такому значенні рН поживного середовища за 48 год.

Таблиця 2.

Антимікробна активність супернатантів *Lactobacillus acidophilus* в залежності від рН середовища

Тест-мікроорганізми	Діаметр зони затримки росту при різних значеннях рН, мм							
	рН 3,0	рН 4,0	рН 5,0	рН 6,0	рН 7,0	рН 8,0	рН 9,0	рН 10
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6533	10,4±1,2	20,1±3,3	21,2±2,1	19,4±1,4	17,3±2,1	13,0±3,1	14,2±1,2	—

Продовження таблиці 2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	—	15,2±1,2	15,3±2,4	13,4±1,1	14,3±2,3	14,1±2,4	12,0±2,1	—
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10,1±2,4	17,4±2,3	18,3±3,1	16,1±2,4	12,4±1,2	10,3±1,3	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	10,4±2,1	22,2±2,4	24,4±3,1	20,1±1,2	20,2±2,3	16,3±3,4	13,1±1,1	10,4±1,3
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	—	12,3±1,4	16,1±2,1	15,4±1,3	15,2±2,1	13,4±1,2	10,2±1,4	—

Примітки:1. $P \leq 0,5$, $n=5$;

2. "—" зона затримки росту відсутня.

Таким чином, слід зазначити, що мінімальним значенням рН для культивування *Lactobacillus acidophilus* є рН 4,0, а максимальним рН 9,0 на експериментальному середовищі СТС.

Процес культивування будь-якого мікроорганізму – це складна багатofакторна система, де вагомий вплив здійснюють сукупність кількісних і якісних факторів: температура та час культивування, наявність джерел освітлення та аерації, якісний склад поживного середовища тощо. На сьогоднішній день для вивчення великої кількості перемінних на характеристики продукту рекомендується застосовувати методи математичного планування експерименту, які дозволяють скоротити кількість проведених експериментів та обрати такі значення параметрів процесу, які дозволять отримати готовий продукт з потрібними властивостями.

Для математичного планування експерименту з визначення оптимальних умов культивування *Lactobacillus acidophilus* на середовищі експериментального складу було використано статистично графічну систему Statgraphics Plus for Windows. При проведенні вибору параметрів культивування *Lactobacillus acidophilus* були вибрані наступні фактори (X) та межі їх значень:

X_1 – час культивування (за попередніми дослідженнями), год;

X_2 – температура культивування (за визначником Берджі), °C;

X_3 – рН поживного середовища (за попередніми дослідженнями).

В якості функції відгуку Y обрали десятковий логарифм кількості життєздатних бактерій, які накопичуються в поживному середовищі, оскільки пропонується використовувати експериментальне середовище для накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* при виробництві пробіотичних заквасок.

Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині визначали за методом Коха у КУО/мл.

Створення моделі дозволило отримати кількісну інформацію про вплив кожного фактора на функцію відгуку, розрахувати значення функції відгуку при заданих параметрах культивування та провести його оптимізацію. У табл. 3 наведено план експерименту – умови проведення дослідів повного трьохфакторного аналізу.

Таблиця 3.

План експерименту

Характеристика планів	Час культивування (X_1), год	Температура культивування (X_2), °C	pH поживного середовища (X_3), од.
Основний рівень	72	35	6,5
Інтервал варіювання	6	1	0,5
Верхній рівень	18	40	9,0
Нижній рівень	126	30	4,0

Було підготовлено та простерилізовано зразки поживного середовища з певним значенням pH, внесено посівний матеріал *Lactobacillus acidophilus* $1 \cdot 10^5$ КУО/мл до кожної колби та витримано у термостаті ТСО-80 за умов, зазначених в плані експерименту. Для виявлення впливу найбільш суттєвих факторів процесу культивування було отримано математичну модель (табл. 4).

Таблиця 4.

Матриця планування і результати експерименту

№ дослідів	Фактор			Функція відгуку
	X_1	X_2	X_3	Y
1	18	30	4	5,43
2	126	30	4	19,41
3	18	40	4	5,1
4	126	40	4	12,4
5	18	30	9	9,26
6	126	30	9	18,7
7	18	40	9	6,2
8	126	40	9	8,3

На основі результатів експерименту розраховано коефіцієнти регресії для функції відгуку Y .

Вільний член = $10,6 \pm 0,0825$

$$\begin{aligned}
 X_1 &= 4,1025 \pm 0,165 \\
 X_2 &= -2,6 \pm 0,165 \\
 X_3 &= 0,015 \pm 0,165 \\
 X_1 X_2 &= -1,7525 \pm 0,165 \\
 X_1 X_3 &= -1,2175 \pm 0,165 \\
 X_2 X_3 &= -0,765 \pm 0,165
 \end{aligned}$$

В результаті математичної обробки запланованого експерименту одержано регресивне рівняння у вигляді:

$$Y = 10,6 + 4,1025X_1 - 2,6X_2 + 0,0157X_3 - 1,7525X_1X_2 - 1,2175X_1X_3 - 0,765X_2X_3.$$

Рівняння дає уявлення про кількісний вплив кожного фактору на кількість життєздатних мікроорганізмів в процесі культивування та показує можливість управління цим процесом.

Для визначення найбільш суттєвого впливу означених параметрів культивування доцільно використовувати Парето-карту (рис. 1).

Standardized Pareto Chart for Cultivat

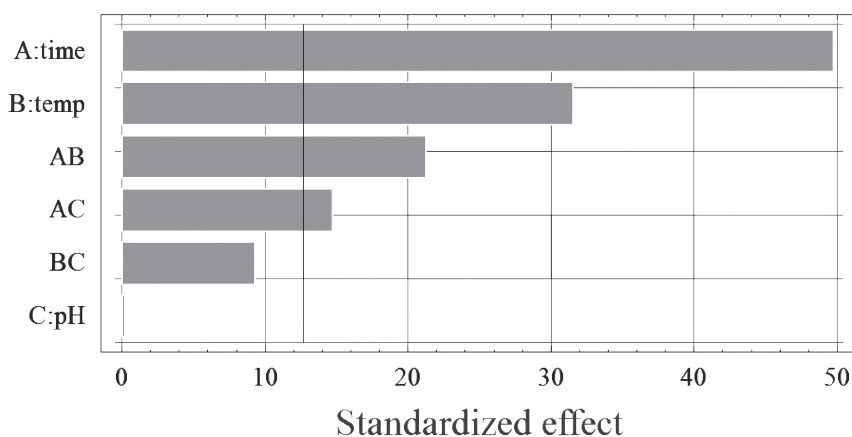


Рис. 1. Парето-карта кількості життєздатних мікроорганізмів в залежності від впливу різних умов культивування

На карті Парето (рис. 1) видно, що статистично значущі ефекти мають: час культивування (X_1), температура культивування (X_2), сукупна дія часу та температури (X_1X_2), взаємодія часу культивування та рН поживного середовища (X_1X_3). На це вказує той факт, що відповідні стовпці перетинають вертикальну пряму, що відповідає 95 % тесту для визначення значущості.

Тому математичне моделювання технологічного процесу у вигляді рівняння регресії слід навести в наступному вигляді:

$$Y = 10,6 + 4,1025X_1 - 2,6X_2 - 1,7525X_1X_2 - 1,2175X_1X_3.$$

До нього не увійшли фактор X_3 і взаємодії факторів X_1X_3 , X_2X_3 як статистично не значущі (їх величини знаходяться нижче рівня 95 % значущості на Парето-карті). Створення математичної моделі дозволило отримати кількісну інформацію про вплив кожного фактора на функцію відгуку, розрахувати значення функції відгуку при заданих параметрах культивування та провести його оптимізацію.

Надалі за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel було визначено оптимальні значення параметрів культивування *Lactobacillus acidophilus* на поживному середовищі СТС:

- час культивування – 78 год;
- температура культивування – 38 °C;
- рН поживного середовища – 5 од..

Проведений комплекс досліджень з використанням методу математичного планування експерименту дозволив отримати теоретично обґрунтовані параметри ведення технологічного процесу культивування *Lactobacillus acidophilus* на поживному середовищі СТС (із сироваткою, екстрактом топінамбура, спіруліною).

Висновки. На основі даних літератури теоретично обґрунтовано необхідність оптимізації умов культивування при розробці альтернативних видів поживних середовищ, які дозволяють інтенсифікувати процес виробництва пробіотичних препаратів і заквасок на стадії накопичення культури.

Вперше теоретично та експериментально визначено режим культивування *Lactobacillus acidophilus* на поживному середовищі із сироваткою, топінамбуром та спіруліною (температура – 38 °C, рН – 5, час – 78 год). Експериментально показано вплив часу культивування на динаміку накопичення культури *Lactobacillus acidophilus* на експериментальному поживному середовищі СТС, вплив рН поживного середовища на антимікробні властивості біооб'єкта *Lactobacillus acidophilus*. Розроблено математичну модель процесу культивування *Lactobacillus acidophilus*. Одержані результати є підставою для проведення подальших досліджень з метою масштабування процесу накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* на експериментальному поживному середовищі СТС.