

Наукова робота на тему:

«Перспективи використання *Lactobacillus reuteri* у харчовій та фармацевтичній галузях»

Шифр «пробіотичні мікроорганізми»

Напрямок «Технологія переробки продуктів тваринництва»

Анотація

У даній науковій роботі розглянуто перспективи використання виду *Lactobacillus reuteri* у різних галузях господарства, зокрема у фармації та харчовій промисловості.

Описані властивості цього виду та його експериментальне виділення у лабораторних умовах. Проведено дослідження морфологічних та фізіологічних властивостей *Lactobacillus reuteri*.

Представлена розробка пробіотичного лікарського засобу на основі даного виду та можливість його застосування у сучасній фармації.

Ключові слова: *Lactobacillus reuteri*, пробіотики, лікарські засоби.

Annotation

In this scientific research are depicted perspectives of the use of species *Lactobacillus reuteri* in different sectors of the economy, especially in pharmacy and food technologies.

There are described properties of this species and experimental isolation in laboratory conditions. The study of morphology and physiology of *Lactobacillus reuteri* was conducted.

The exhibit of new probiotic medicine based on this species is described.

Key words: *Lactobacillus reuteri*, probiotics, medicine.

Зміст

Вступ	4
Розділ I Огляд літератури	6
1.1. Мікробіота шлунково-кишкового тракту людини	6
1.2. Морфологія і фізіологія <i>Lactobacillus reuteri</i>	7
1.3. Застосування <i>Lactobacillus reuteri</i>	8
1.4. Пробіотики та їх поширення на українському фармацевтичному ринку	10
Розділ II Матеріали та методи досліджень	12
Розділ III Результати та їх обговорення	12
3.1. Отримання та морфологічна характеристика нагромаджувальної культури <i>Lactobacillus reuteri</i>	12
3.2. Перевірка фізіологічних властивостей <i>Lactobacillus reuteri</i>	15
3.3. Розробка експериментального лікарського засобу	18
Висновки	31
Список використаних джерел	32

Вступ

Щорічно зростає кількість людей, що мають різноманітні розлади шлунково-кишкового тракту. Серед порушень функціонування травної системи людини важливе місце займає дисбактеріоз, що є однією з найпоширеніших «хворіб цивілізації». Існує багато причин виникнення дисбактеріозу, крім нестачі нуртієнтів, мінералів, вітамінів, харчових волокон, найважливішою причиною є надмірне використання антибіотиків широкого спектру дії.

Антибіотики широкого спектру дії використовуються не тільки для лікування в екстрених ситуаціях, коли необхідно ефективно захистити організм людини від різної патогенної мікрофлори, але й як профілактично міра, що є абсолютно неефективно і шкідливо для організму людини. Згідно статистичних даних, щороку у США витрачають близько 10 млрд. доларів США на антибіотики. Проте, деякі функціональні розлади здоров'я людини можна виправити за допомогою пробіотиків.

Пробіотики — це живі мікроорганізми, які можуть позитивно впливати на здоров'я людини, нормалізувати склад і функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту.

Пробіотичні лікарські засоби є не тільки високоефективними проти умовно-патогенних бактерій, вони забезпечують відновлення здорової мікробіоти шлунково-кишкового тракту, що дозволяє отримати швидше одужання та нормальне функціонування організму в цілому.

Найбільш ефективним буде використання як пробіотиків тих бактерій, що є автохтонними для людини і продукти з яких легко і дешево виробляти у промисловості. Тому найчастіше у склад різних пробіотиків входять представники роду *Lactobacillus* завдяки їхній фізіологічній та технологічній значимості.

Створення харчових продуктів та лікарських засобів, що володіють пробіотичними властивостями, є одним з найважливіших завдань, що стоїть перед біотехнологами, фармацевтами та харчовими технологами.

На основі наукових досліджень можна зробити висновок, що впровадження біологічно-активних добавок у доступній для споживача формі є конк-

ретним та перспективним завданням для розвитку галузі. Тому, у цій роботі запропоновано та розглянуто створення пробіотичного лікарського засобу на основі *Lactobacillus reuteri*.

Розділ I Огляд літератури

1.1. Мікробіота шлунково-кишкового тракту людини

Склад мікрофлори кишечника дуже неоднорідний і залежить не тільки від ділянки шлунково-кишкового тракту (ШКТ), а й від статі, віку, харчових звичок людини. Загалом у шлунково-кишковому тракті людини налічується понад 400 видів різних мікроорганізмів, серед яких найпоширенішими родами є *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*. Найважливішими фактом, що впливає на склад мікрофлори є такі фізіологічні та морфологічні особливості ділянок ШКТ:

- в шлунку ріст мікроорганізмів обмежується кислим середовищем (низький рівень рН);

- уздовж тонкої кишки концентрація мікроорганізмів поступово збільшується, аж до товстого кишечника, де спостерігається максимальна концентрація мікроорганізмів.

Анаеробні бактерії становлять 95% всієї мікрофлори кишечника, тоді як аеробні — всього 5%. Проте, у товстому кишечнику, де строго анаеробні умови спостерігається співвідношення анаеробів до аеробів, як 1000:1 [4].

Людина та її мікроорганізми – єдина симбіотична система, за рахунок якої людський організм може нормально функціонувати, а мікроорганізми виживати і далі поширюватись у екосистемі. У ШКТ людини мікробіота являє собою тонку біоплівку (рис. 1), яка кріпиться до епітеліоцитів слизових оболонок і відіграє важливу роль у формуванні здоров'я, забезпечуючи:

- імунну функцію (синтез імуноглобулінів, забезпечення функціонування імунних клітин);
- травлення та синтез важливих метаболітів (ферментів, вітамінів);
- «мікробний фільтр», який заважає адгезії на поверхні кишечника патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів;

- забезпечує трофічний та енергетичний зв'язок між клітинами слизової оболонки;
- виконує детоксикуючу функцію [5, 6, 7].

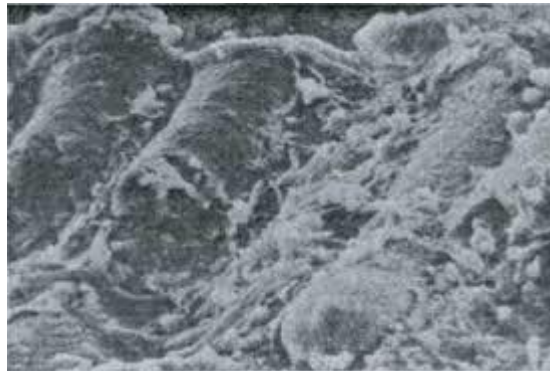


Рис. 1. Біоплівка епітелію кишечника

Загалом мікробіота ШКТ – унікальна для кожної людини динамічна система, яка змінюється з часом та адаптується відповідно до потреб та стану організму.

1.2. Морфологія і фізіологія *Lactobacillus reuteri*

Як вже було зазначено, до основних представників мікробіоти людини належать представники родини *Lactobacillus*, типовим представником родини є *Lactobacillus reuteri*, який проявляє такі морфологічні та фізіологічні властивості:

- грампозитивні паличкоподібні мікроорганізми, які з часом змінюють свою морфологію до більш зігнутих форм;
- має здатність до адгезії до муцину епітеліоцитів. Можливий механізм даного процесу пов'язують зі здатністю *L. reuteri* виробляти поверхневі речовини (муцин-зв'язуючі протеїни, D-аланін-LTA, екзополісахариди, глюкозилтрансферазу А, інулінсахарозу), що сприяють адгезії і формуванню активної біоплівки. Дана біоплівка відіграє роль у імунітеті шляхом синтезу реутерину та модуляції цитокінінів, імуностимулюючих факторів та супресуванням виробництва фактора некрозу пухлин (ФНП) [12];

- бактеріям цього роду притаманна антагоністична дія проти різних родів патогенних мікроорганізмів, зокрема *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* і *Staphylococcus* та у меншій мірі вони впливають на роди *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* і *Lactobacillus*. Бактерії цього роду проявляють фунгіцидну дію на представників родів *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium* та протизойну на паразитичний вид *Trypanosoma cruzi* [12-14];

Даний вид був виділений з різних частин ШКТ (тонкого кишечника, шлунку, калу, товстого кишечника) людини, мишей, свиней, щурів, курей та індичок Герхардом Ройтером наприкінці 1960-х років [8, 9]. Проте, крім травного тракту, *L. reuteri* були знайдені і в грудному молоці жінок, при чому у різних країнах світу [10].

Як і вся природня мікрофлора, *L. reuteri* зазнає значного агресивного впливу від використання антибіотиків. У зв'язку з цим можна спостерігати розлади травлення та збільшення частоти випадків запальних хворіб у пацієнтів, у яких виявлено зниження або відсутність клітин *L. reuteri* [11].

Як вже зазначалось вище, одним із факторів формування імунної відповіді за допомогою *L. reuteri* є синтез антибактеріальних речовин, таких як перекис водню, реутерин, реутицелін [15]. Найважливішим з точки зору промислового використання є реутерин – це еквімолярна суміш мономерних, гідратованих мономерних і циклічних димерних форм бета-гідроксипропіональдегіду [16]. При мікробіологічному синтезі його вихідною речовиною є гліцерин, тому цей синтез можна відтворити у лабораторних умовах, проте з дотриманням умов, які характерні для життя даного виду ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5-7$, анаеробні умови) [16, 13].

1.3. Застосування *Lactobacillus reuteri*

Для вирішення проблеми з надмірним використанням антибіотиків все ширше використання у фармацевції та харчовій промисловості отримують автохтонні для людини види, такі як *L. reuteri*.

Цей вид проявляє значний терапевтичний ефект на здоров'я людей та тварин, у ШКТ яких він поширений.

Для фармакологічної та ветеринарної галузей *L. reuteri* можна застосовувати для:

- виробництва вітамінів В₁₂, В₉ та α-лізину [17];
- лікування мієлоїдної лейкемії, хвороби Крона, остеопорозу;
- виробництва пробіотичних лікарських препаратів (штами АТСС 55730, *L. reuteri* DSM 17938 (торгова назва *L. reuteri* *Protectis*)) [18];
- покращення стану ротової порожнини (зменшення частоти кровотеч з ясен, зменшення кількості зубного нальоту), для цього використовуються штами *L. reuteri* DSM 17938 і *L. reuteri* АТСС РТА 5289 (торгівельна назва *L. reuteri* *ProDentis*) [19];
- попередження виникнення гастриту шляхом зв'язування *Helicobacter pylori* за допомогою синтезу сульфід-зв'язуючого білка [20];
- лікування коліків у немовлят при використанні дитячого харчування з додаванням штаму *L. reuteri* 17938 [21, 22];
- використання штаму *L. reuteri* АТСС РТА 6475 для попередження розвитку остеопорозу, викликаного нестачею естрогену в період менопаузи [24];
- використання штаму *L. reuteri* NCIMB 30242, як добавку у кисломолочні продукти для зниження рівня холестерину у крові людей [23];
- використання штаму *L. reuteri* 15007 (торгівельна назва *L. reuteri* *fermentum*) у кількості 6×10^9 КУО/день у кормах для поросят для покращення стану здоров'я тварин після відлучення від матері [15].

Отже, зважаючи на такий значний вплив на організм людини існує серйозна необхідність впровадження цього виду у промислове застосування для покращення загального стану здоров'я.

1.4. Пробиотики та їх поширення на українському фармацевтичному ринку

Пробиотики – це бактеріальні препарати з живих мікроорганізмів, які є представниками нормальної мікрофлори людини і призначені для профілактики ряду захворювань.

Не всі мікроорганізми можуть бути пробіотиками, оскільки для них висуваються строгі вимоги, адже при виборі неправильних мікроорганізмів може бути завдана непоправна шкода людському здоров'ю. До мікроорганізмів-пробиотиків висуваються наступні вимоги:

- брати активну участь в у формуванні імунітету господаря шляхом біохімічного впливу на умовно-патогенну мікрофлору;
- синтезувати важливі для діяльності організму речовини, а саме: вітаміни, ферменти, антибіотики, гормоноподібні речовини тощо;
- брати участь у метаболізмі різноманітних поживних речовин;
- проводити детоксикацію організму від ендогенних та екзогенних токсинів, проводити антимутагенну і антиалергічну дію;
- підтримувати сталі фізико-хімічні умови в приепітеліальній ділянці;
- теплове забезпечення організму;
- ховати у собі мікробні плазмідни та хромосомні гени [1].

Отже, з вище наведеного списку вимог до пробіотиків, можна зробити висновок, що не всі види мікроорганізмів можуть використовуватись. В основному, як пробіотики у фармації та харчовій промисловості використовують представників родів *Bifidobacterium* (серед них найпоширеніші *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve*) та *Lactobacillus* (серед них найпоширеніші *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. helveticus*).

Для створення максимально ефективного препарату використовують не тільки один штам мікроорганізму, а намагаються їх комбінувати, базуючись на їх трофічних зв'язках та технологічних властивостях. Відповідно, існує п'ять різних поколінь пробіотичних препаратів.

Є п'ять поколінь пробіотиків:

I покоління – монокомпонентні препарати, які містять один штам бактерій (біфідобактерій, лактобактерій, колібактерій, аерококів);

II покоління – антагоністи, які самостійно елімінуються організмом і містять спорові бацили та дріжджеподібні гриби;

III покоління – комбіновані препарати, які містять різні штами мікроорганізмів одного або різних видів;

IV покоління – синбіотики – це різновид комбінації пробіотичного і пребіотичного компонентів;

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

На фармацевтичному ринку України представлені всі покоління пробіотиків у різних лікарських засобах, що наведені у табл. 1 [2, 3].

Таблиця 1

Класифікація пробіотиків за поколіннями

Покоління пробіотиків	Вид бактерій	Назва препарату
I покоління	Біфідобактерії	Біфідумбактерин, Біфідумбактерин Форте, Біфікол, Біфіліз, Пробіфор, Біфіфор
	Лактобактерії	Лактобактерин, Лактовіт Форте, Лацидофіл,
II покоління	Колібактерії	Мутафлор
III покоління	Лактобактерії, Біфілобактерії, Коки	Лактомун, Лактіале, Лакто, Лактімак, Ацидолак, Лінекс, Лаціум
IV покоління	Бацили	Біоспорин, Субалін, Ентерожерміна.
	Сахароміцети	Ентерол 250, Нормагут
V покоління		Хілак, Хілак Форте

Розділ II Матеріали та методи

Нагромаджувальну культуру отримували шляхом ресуспендування аліквоти дитячого харчування «Nestogen 4» у фізіологічному розчині та посіву суспензії на поживне середовище сусла-агар (6^0 Б). Шляхом проведення ряду пасажей на сусло-агарі з 2% CaCO_3 отримали чисту культуру, яка за морфологічними характеристиками колоній, будовою клітин та їх тінкторіальними властивостями відповідала виду *Lactobacillus reuteri*.

Клітини виділеного штаму, а також інших представників родини *Lactobacteriaceae* фарбували фуксином або за Грамом згідно стандартних методик і розглядали в світлопольний мікроскоп «Біолам» при збільшенні 15×90 .

В якості середовищ для культивування використовували молоко «Селянське ультрапастеризоване» (3,2 % жирності) та «Mlekovita» (безлактозне молоко 3,2 % жирності, виробник Польща). Вибір останнього субстрату був обумовлений зацікавленістю про можливість створення пробіотичного продукту для цієї категорії населення, яка має алергічну реакцію на лактозу.

Титровану кислотність молока та отриманих продуктів проводили стандартним методом титрування з 0,1 н NaOH [27]. Лактозу визначали йодометричним методом. Антибіотикограму проводили зі стандартними дисками диско-дифузійним методом згідно рекомендацій [26].

Розділ III Результати та їх обговорення

3.1 Отримання та морфологічна характеристика нагромаджувальної культури *Lactobacillus reuteri*

Для отримання та морфологічної характеристики чистої культури *L. reuteri* було проведено такі етапи:

1. Отримання нагромаджувальної культури.

На даному етапі з монокультурального дитячого харчування «Nestogen 4» шляхом послідовного висівання на чашки Петрі з сусло-агаром та додаванням 2% CaCO₃ після 48 годин культивування отримано бежеві колонії з ризоїдними краями, складчастої форми, зверху злегка припідняті, шкірястої структури.



Рис. 2. Колонії виду *L. reuteri* на середовищі сусло-агару з додаванням 2% CaCO₃ після 48 годин культивування

2. Визначення чистоти отриманої культури.

На даному етапі відбулось мікроскопування отриманої чистої культури у порівнянні з попередньо вирощеною на сусло-агарі культурою препарату «Linex», у якому містяться *L. acidophilus* (ssp. *L. gasseri*) та *Enterococcus faecium*.

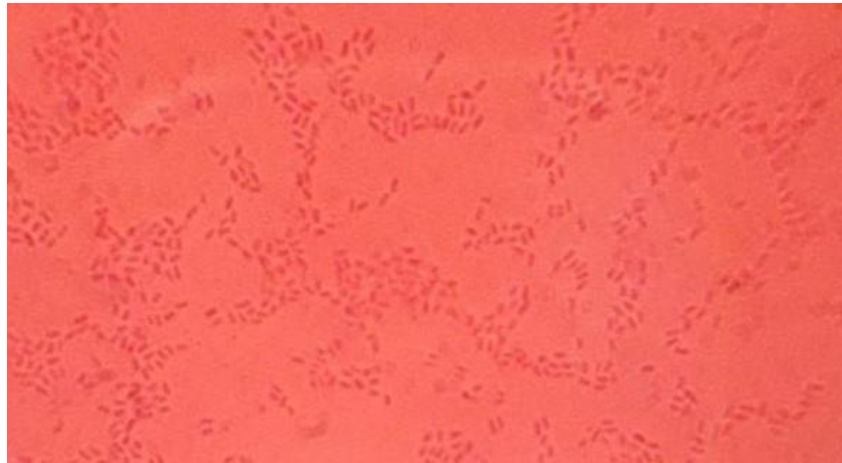


Рис. 4. Морфологія бактерій *L. reuteri* (збільшення 15х90 разів)

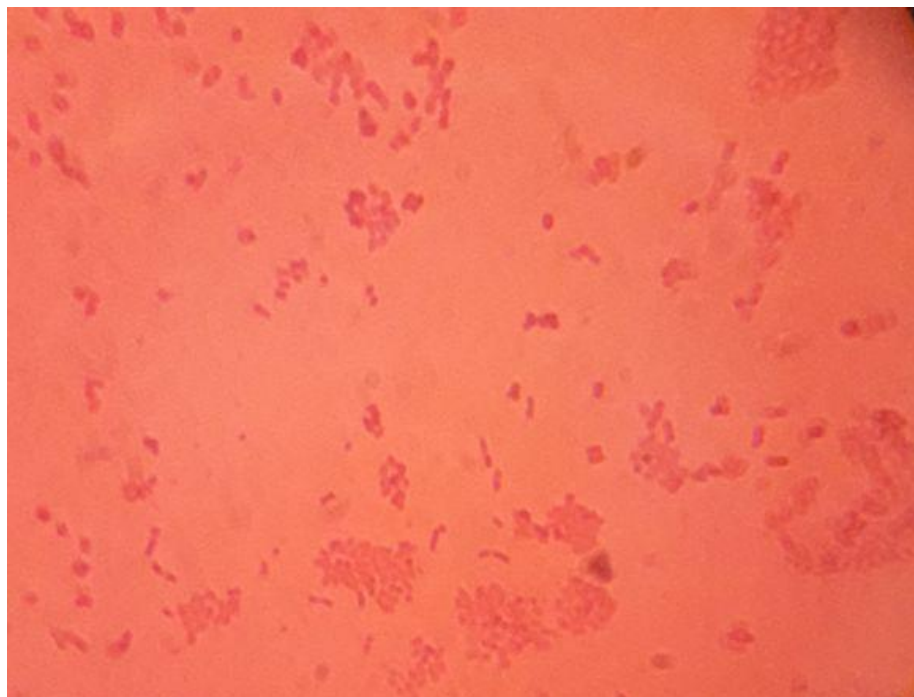


Рис. 5. Морфологія бактерій препарату «Лінекс» (збільшення 15х90)

У результаті мікроскопування препарату «Лінекс» були знайдені клітини короткої товстої паличкоподібної форми та диполококи, що є очікувано для даного препарату.

У виділеній культурі *L. reuteri* були знайдені тільки короткі товсті паличкоподібні клітини, що повністю відповідає літературним даним.

3. Фарбування за Грамом

Згідно літературних даних *L. reuteri* - грампозитивна культура, тому для встановлення відповідності виділеної культури з дитячого харчування до очікуваних характеристик було проведене фарбування за Грамом.

Для цього використовувалась добова культура досліджуваного виду, мікроскопування проводилось при збільшенні 9×90, і у результаті фарбування культури стали фіолетовими, що видно на рис. 6.

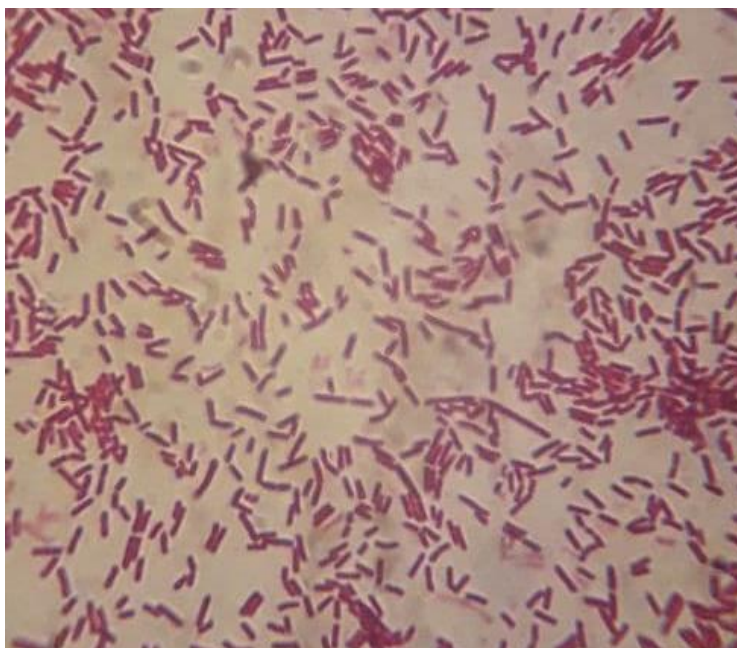


Рис. 6. Фарбування за Грамом добової культури досліджуваного виду (збільшення 9×90)

У результаті морфологічного аналізу можна стверджувати, що отримана культура мікроорганізмів належить до виду *L. reuteri*.

3.2. Перевірка фізіологічних властивостей *Lactobacillus reuteri*

Всі молочнокислі бактерії мають здатність зброджувати молоко з різною ефективністю. Наприклад, існують такі активні кислотоутворювачі як *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, які мають широке використання у харчових технологіях для виробництва кисломолочних продуктів.

Для перевірки зброджувальної здатності отриманої культури проводилась серія експериментів:

1. Проводилось зброджування молока «Селянське ультрапастеризоване» (3,2% жирності) досліджуваною культурою та як контроль проводилось ферментація тої ж сировини за допомогою йогурта «Галичина», ферментація проводилась у двох групах дослідів з чотирьохкратним повторенням та контролем

протягом 48 годин з вимірюванням кислотності на початку закладання досліду, через 8, 24 та 48 годин.

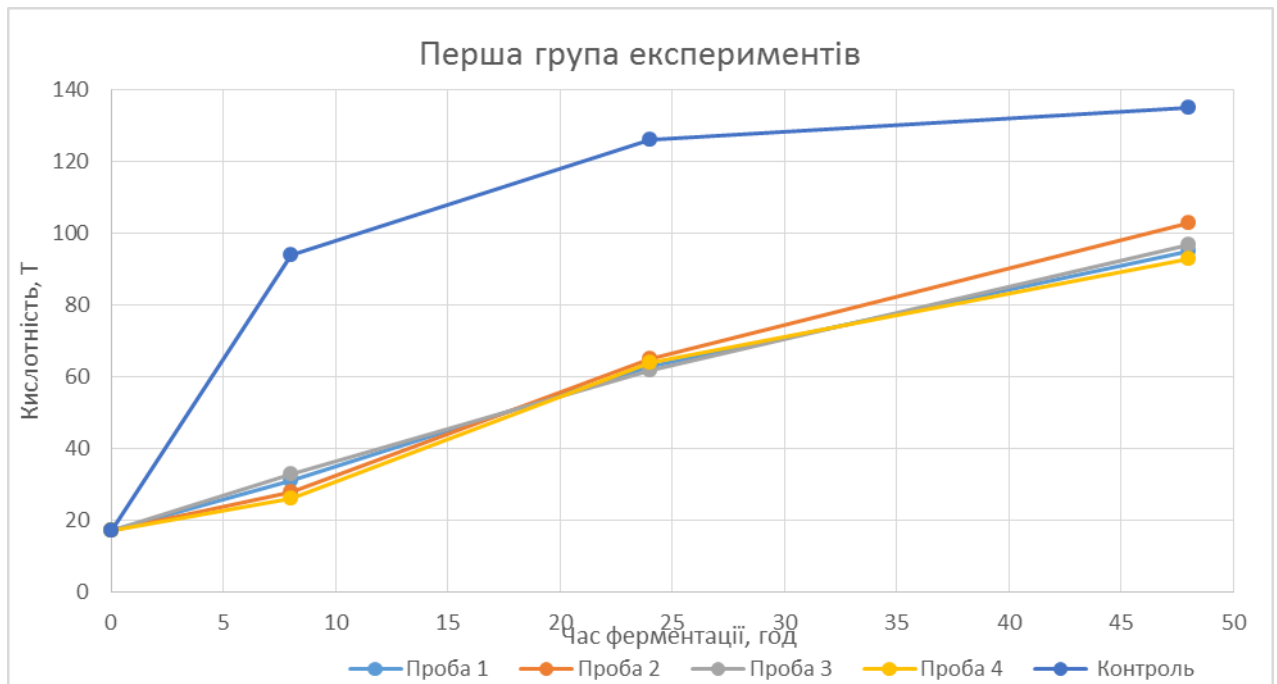


Рис. 7. Результати ферментації у першій групі першого експерименту

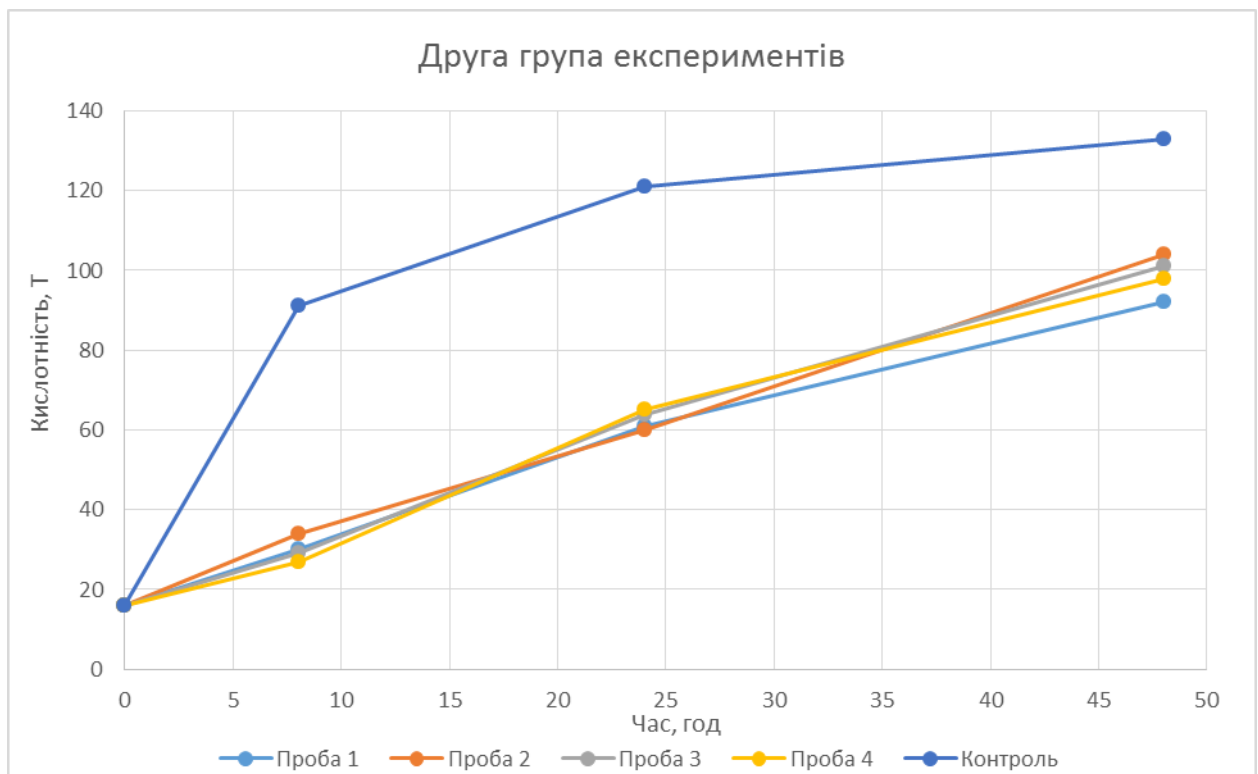


Рис. 8. Результати ферментації у другій групі першого експерименту

У результаті проведених дослідів можна побачити, що зброджувальна активність проявляється лише на другу добу ферментації, що свідчить про те, що вид *L. reuteri* є слабким кислотоутворювачем.

2. Відбувалось зброджування безлактозного молока «Млековита» (3,2% жирності) досліджуваною культурою та як контроль проводилась ферментація тої ж сировини за допомогою йогурта «Галичина», ферментація проводилась у двох групах дослідів з чотирьохкратним повторенням та контролем протягом 48 годин з вимірюванням кислотності на початку закладання дослідів, через 8, 24 та 48 годин.

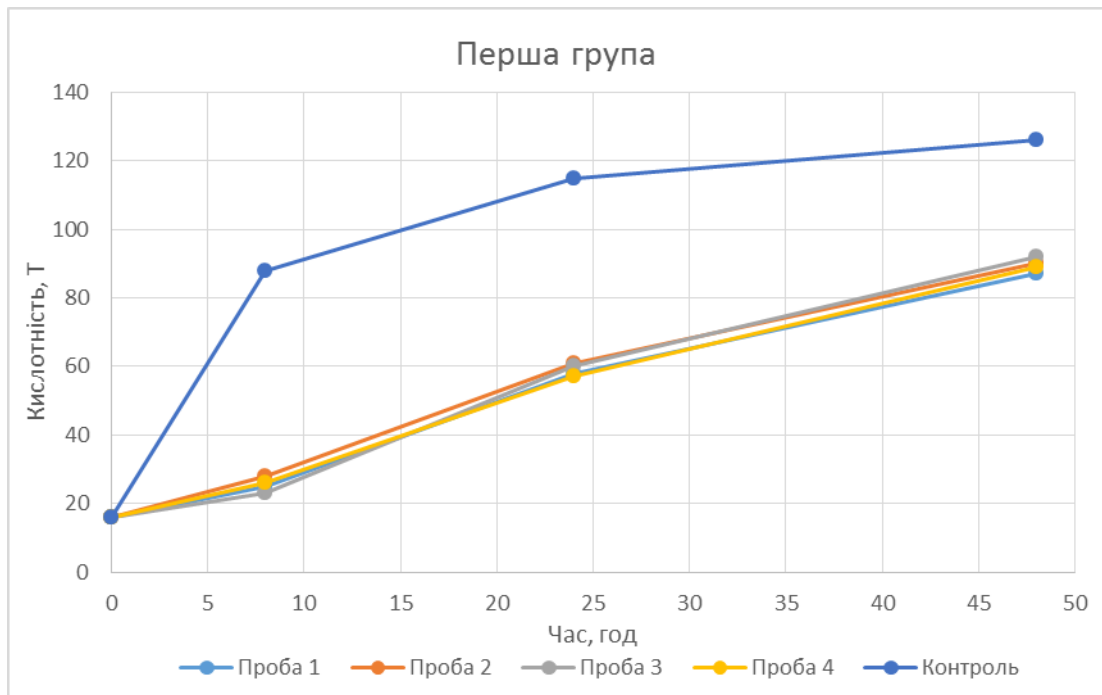


Рис. 9. Результати ферментації у першій групі другого експерименту

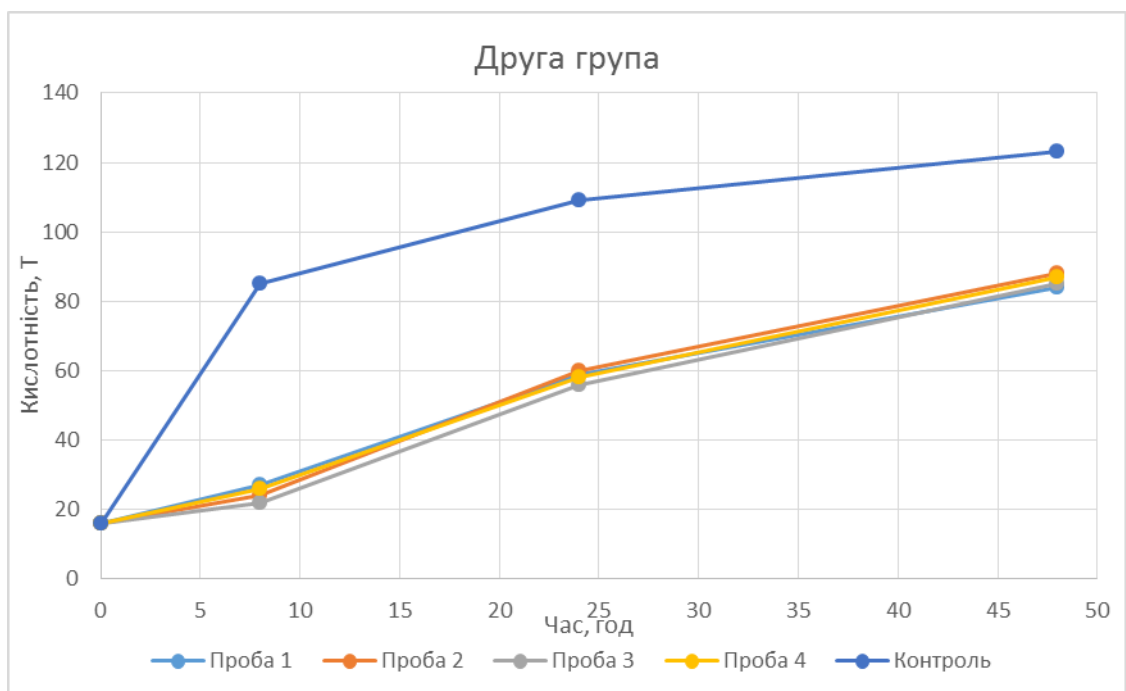


Рис. 10. Результати ферментації у другій групі другого експерименту

Експерименти на безлактозному молоці показав, що ферментація відбувається ще повільніше, хоча все ще спостерігається після першої доби підвищення ферментативних процесів, ймовірно через низький вміст лактози у середовищі.

Відповідно до цих результатів доцільність виробництва монокультуральних кисломолочних продуктів на основі *L. reuteri* є низькою, тому зацікавлення викликає виробництво пробіотичних лікарських засобів.

Згідно вимог до пробіотиків, мікроорганізми мають бути чутливими до антибіотиків, тому було проведено антибіотикограму для *L. reuteri* [1].

Дане дослідження проводилось у трьохкратному повторенні диско-дифузійним методом [26]. Перевіряли резистентність до таких антибіотиків як: ванкоміцин, стрептоміцин, ристоміцин, левоміцетин, лінкоміцин.

Таблиця 2

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків

Антибіотик	Зони затримки росту, см	Чутливість
Ванкоміцин	2±0,1	Мало-чутливі
Стрептоміцин	2±0,1	Мало-чутливі
Ристоміцин	1,5±0,05	Мало-чутливі
Левоміцетин	1,4±0,05	Мало-чутливі
Лінкоміцин	2,5±0,1	Помірно чутливі

Як видно з отриманих результатів вид *L. reuteri* є достатньо безпечним для використання у фармацевтичній промисловості. Помірна чутливість до різноманітних антибіотиків свідчить на користь ймовірності використання цього виду для виробництва пробіотичних добавок.

3.3. Розробка експериментального лікарського засобу

На основі отриманих літературних та експериментальних даних можна побачити доцільність виробництва лікарського засобу на основі *L. reuteri*. У зв'язку з безсумнівною користю застосування цих бактерій, але їхньої низької кислотоутворювальною властивістю виникла пропозиція використовувати суспензію. Цих бактерій у такій лікарській формі як саше.

Схема виробництва лікарських засобів у формі саше виглядає так:

1. Перед безпосереднім виробництвом лікарського засобу відбувається підготовка поживного середовища та його стерилізація, а також нарощування живої культури.

2. I стадія – приріст біомаси, коли поживне середовище та жива культура знаходяться в оптимальних умовах у реакторі.

3. II стадія – фільтрування на якій відбувається відділення культивованих мікроорганізмів від поживного середовища.

4. III стадія – утворення суспензії, якому передують приготування стерильного розчину сахарози.

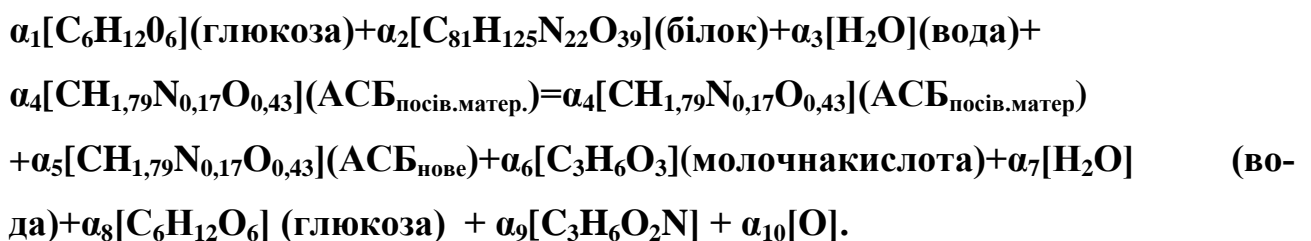
5. Фасування у паперові пакети [26].

Для розрахунку лікарського засобу на основі *L. reuteri* складемо матеріальний баланс процесу.

Стадії процесу:

1. Культивування	$\eta_1=1$
2. Фільтрування	$\eta_2=0,98$
3. Утворення суспензії	$\eta_3=0,84$
	$\eta_{\text{заг}}=0,83$

Отже, оскільки процес культивування є анаеробним, як поживне середовище використовують МРС, воду для розчинення та чисту культуру лактобацил, тоді інтегральне стехіометричне рівняння робочої ферментації виглядає:



Молекулярні маси продуктів

Назва речовини	Молекулярна маса
Глюкоза Mr (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180
Білок Mr (C ₈₁ H ₁₂₅ N ₂₂ O ₃₉)	2029
Вода Mr (H ₂ O)	18
АСБ Mr (CH _{1,79} N _{0,17} O _{0,43})	23,05
Молочна кислота Mr (C ₃ H ₆ O ₃)	90
Mr (C ₃ H ₆ O ₂ N)	107
Mr[O]	16

Якщо прийняти, що $\alpha_1 = 1$ для крохмалю, тоді вирахуємо $\alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$ для білка, води і АБС відповідно за такими рівняннями:

$$\frac{\alpha_1 \times 180}{\alpha_2 \times 2029} = \frac{2}{1} \text{ звідси } \alpha_2 = 0,0444$$

$$\frac{\alpha_1 \times 180}{\alpha_3 \times 18} = \frac{2}{1} \text{ звідси } \alpha_3 = 471,05$$

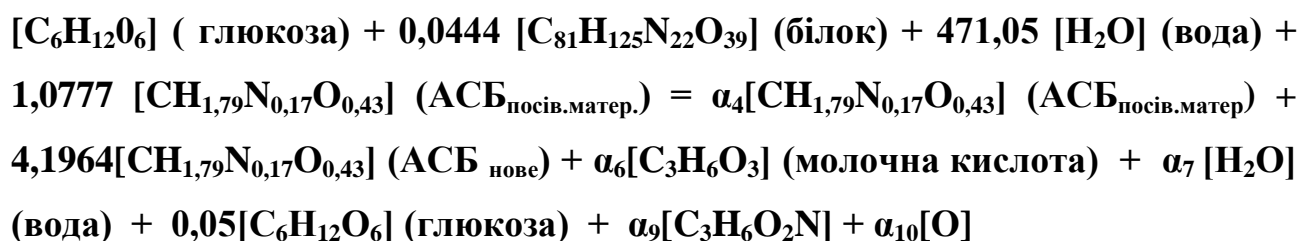
$$\frac{\alpha_1 \times 180}{\alpha_4 \times 23,05} = \frac{2}{1} \text{ звідси } \alpha_4 = 1,0777$$

Прийmemo, що не прореагувало 5% глюкози і відповідно $\alpha_8 = 0,05$.

Знайдемо також стехіометричний коефіцієнт білка, що утворився:

$$\alpha_5 = 0,1 \times 6 + 0,0444 \times 81 = 4,1964$$

Якщо врахувати отримані значення $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5, \alpha_8$ то стехіометричне рівняння балансу виглядатиме так:



Далі необхідно скласти матеріальний баланс для атомів карбону до і після ферментації (табл. 4).

Баланс за атомами карбону

Таблиця 4

До ферментації				Після ферментації			
Речовина	Кількість атомів карбону в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні	Речовина	Кількість атомів карбону в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні
Глюкоза	6	1	6	АСБ	1	4,1964	4,1964
Білок	81	0,0444	3,5964	$C_3H_6O_3$	3	α_6	$\alpha_6 * 3$
				$C_3H_6O_2N$	3	α_9	$\alpha_9 * 3$
				Глюкоза	6	0,05	0,3
Разом			9,5964	Разом			$4,496 + (\alpha_9 + \alpha_6) * 3$

З даних таблиці 4 можна отримати, що $(\alpha_9 + \alpha_6) * 3 = 5,1004$

Наступним кроком є складання балансу за атомами азоту до та після ферментації (табл. 5).

Баланс за атомами азоту

Таблиця 5

До ферментації				Після ферментації			
Речовина	Кількість атомів азоту в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні	Речовина	Кількість атомів азоту в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні
Білок	22	0,0444	0,9768	АСБ	0,17	4,1964	0,7134
				$C_3H_6O_2N$	1	α_9	
Разом			0,9768	Разом			$0,9768 - \alpha_9$

З матеріального балансу для атомів азоту можна знайти α_9 .

$$\alpha_9 = 0,9768 - 0,7134 = 0,2634$$

Знаючи, що $\alpha_9 + \alpha_6 = 5,1004$, а $\alpha_9 = 0,2634$, то

$$\alpha_6 = (5,1004 - 0,2634 * 3) / 3 = 1,4366$$

Далі складаємо відповідний матеріальний баланс для атомів гідрогену до та після ферментації (табл. 6).

Баланс за атомами гідрогену

Таблиця 6

До ферментації				Після ферментації			
Речовина	Кількість атомів гідрогену в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні	Речовина	Кількість атомів гідрогену в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні
Глюкоза	12	1	12	АСБ	0,8	4,1964	0,910
Білок	125	0,0444	5,55	$C_3H_6O_3$	6	1,4366	8,619
H_2O	2	471,05	942,1	$C_3H_6O_2N$	6	0,2634	1,580
				H_2O	2	α_7	
				$C_6H_{12}O_6$	12	0,05	0,6
Разом			959,65	Разом			11,71

З таблиці 6 можна дізнатись, що $\alpha_7 = 470,6674$.

Далі необхідно розписати баланс для кисню (табл. 7).

Баланс для атомів кисню

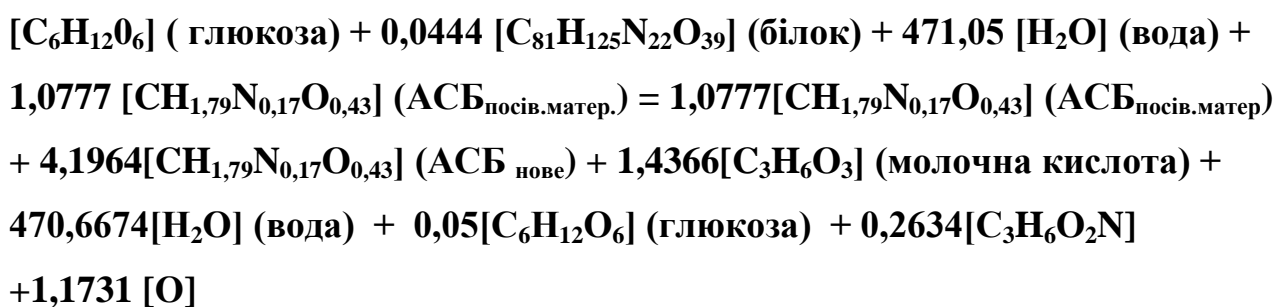
Таблиця 7

До ферментації				Після ферментації			
Речовина	Кількість атомів кисню в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні	Речовина	Кількість атомів гідрогену в брутто-формулі	Стехіометричний коефіцієнт	Кількість атомів в рівнянні
Глюкоза	6	1	6	АСБ	0,43	4,1964	1,080

Білок	39	0,0444	1,7316	$C_3H_6O_3$	3	1,4366	4,309
H_2O	1	471,05	471,05	$C_3H_6O_2N$	2	0,2634	0,526
				H_2O	1	470,6674	470,6
				$C_6H_{12}O_6$	6	0,05	0,3
				[O]	1	α_{10}	
Разом		478,7816		Разом		478,7	
						α_{10}	

З таблиці 7 отримуємо $\alpha_{10} = 1,1731$

Отже, отримавши всі значення α отримуємо таке стехіометричне рівняння матеріального балансу:



Якщо перемножити коефіцієнти на відповідні молекулярні маси і звести все у таблицю, то отримуємо балансову таблицю (табл. 8):

Балансова таблиця для культивування

Таблиця 8

Завантажено			Отримано		
№	Назва продукту	Маса, кг	№	Назва продукту	Маса, кг
1	АБС	24,8409	1	АСБ _{загал}	121,5679
2	Глюкоза	180	2	$C_3H_6O_3$	129,294
3	Білок	90,0876	3	$C_3H_6O_2N$	23,1792
4	Вода	8478,9	4	Вода	8472,0132
			5	Глюкоза	9
			6	[O]	18,7696
Загалом		8773,8285	Загалом		8773,8281

Наступним етапом виробництва саше є фільтрування, за допомогою якого ми будемо відділяти цільовий продукт. Загалом, клітина у собі містить приблизно 15% вологи, відповідно можна розрахувати загальну клітинну масу:

$$405,2266 - 100\%$$

$$X - 15\%$$

$$X = 405,2266 * 0,15 = 70,7954 \text{ кг}$$

$$401,1743 + 70,7954 = 471,9697 \text{ кг}$$

На цьому етапі складаємо балансову таблицю (табл. 9) для процесу фільтрування.

Балансова таблиця для фільтрування

Таблиця 9

Завантажено			Отримано		
№	Назва продукту	Маса, кг	№	Назва продукту	Маса, кг
			Вологий осад		
1	АСБ _{загал}	121,5679	1	АСБ	401,1743
2	C ₃ H ₆ O ₃	129,294	2	Вода	70,7954
3	C ₃ H ₆ O ₂ N	23,1792	Загалом		471,9697
4	Вода	8472,0132	Фільтрат		
5	Глюкоза	9	1	Глюкоза	9
6	[O]	18,7696	2	Вода	12504,0594
			3	C ₃ H ₆ O ₃	129,294
			4	C ₃ H ₆ O ₂ N	23,1792
			5	[O]	18,7679
			6	АСБ	4,0523
Загалом		8773,8281	Загалом		13160,3225

Для того, щоб утворити суспензію необхідно дотримуватись співвідношення 1:2. При утворенні суспензії через зміну складу середовища за допомогою плазмолізу клітина втрачає 15% вологи і відповідно клітинна маса складатиме $471,9697 * 0,15 = 401,1743$ кг, тобто стерильного розчину сахарози прибли-

зно 800 кг. Відповідно складаємо балансову таблицю для етапу утворення суспензії (табл. 10).

Балансова таблиця для утворення суспензії

Таблиця 10

Завантажено			Отримано		
№	Назва продукту	Маса, кг	№	Назва продукту	Маса, кг
1	Клітинна маса	401,1743	1	Суспензія	1201,1743
2	Розчин сахарози	800			
Всього		1201,1743	Всього		1201,1743

Розрахунок проводиться на 10 кг суспензії і відповідно $1201,1743/10 \approx 120$, тоді матеріальний баланс виробництва виглядатиме так:

На стадії культивування, при $\eta_1 = 1$ балансова таблиця (табл. 11) виглядатиме так:

Таблиця 11

Балансова таблиця для процесу культивування

Завантажено			Отримано		
№	Назва продукту	Маса, кг	№	Назва продукту	Маса, кг
1	АБС	0,207	1	АСБ _{загал}	3,3768
2	Глюкоза	1,5	2	$C_3H_6O_3$	1,0774
3	Білок	0,7507	3	$C_3H_6O_2N$	0,1932
4	Вода	70,6575	4	Вода	68,2363
			5	Глюкоза	0,075
			6	[O]	0,1932
Загалом		73,1152	Загалом		73,1151

На другій стадії – фільтруванні при $\eta_1 = 0,99$ балансова таблиця (табл. 12) матиме вигляд:

Балансова таблиця для фільтрування

Таблиця 12

Завантажено			Отримано		
-------------	--	--	----------	--	--

№	Назва продукту	Маса, кг	№	Назва продукту	Маса, кг
			Вологий осад		
1	АСБ _{загал}	3,3768	1	АСБ	3,343
2	C ₃ H ₆ O ₃	1,0774	2	Вода	0,5899
3	C ₃ H ₆ O ₂ N	0,1932	Загалом		3,933
4	Вода	68,2363	Фільтрат		
5	Глюкоза	0,075	1	Глюкоза	0,075
6	[O]	0,1932	2	Вода	104,200
			3	C ₃ H ₆ O ₃	1,0774
			4	C ₃ H ₆ O ₂ N	0,1932
			5	[O]	0,1564
			6	АСБ	0,0338
Загалом		73,1151	Загалом		109,6693

На третій стадії – фільтруванні при $\eta_1 = 0,84$ балансова таблиця (табл. 13) матиме вигляд:

Балансова таблиця для утворення суспензії

Таблиця 13

Завантажено			Отримано		
№	Назва продукту	Маса, кг	№	Назва продукту	Маса, кг
1	Клітинна маса	3,933	1	Суспензія	9,9
2	Розчин сахарози	7,866			
Всього		11,799	Всього		9,9

Для того, щоб дізнатись чи рентабельне виробництво лікарського засобу необхідно розрахувати собівартість продукції, для цього розрахуємо такі показники:

1. Вартість сировини і матеріалів, яку розраховують за формулою:

$$M_c = N_p * C * A,$$

де M_c — вартість сировини і матеріалів, грн.

N_p — норма витрат на одиницю продукції по компонентах, кг.

C — ціна одиниці сировини або матеріалів, грн.

A — об'єм продукції, $A=100$ г.

Згідно сучасних даних вартість сировини буде $M_c = 362,58$ грн (табл. 14).

Вартість сировини

Таблиця 14

№	Найменування матеріалів	Витратний коефіцієнт кг/100г прод.	Ціна 1 кг, грн.	Загальна сума, грн.	Питома вага затрат по матеріалах, %
1	МРС	0,0552	4500,0	248,175	68,13
2	Чиста культура бактерій (Nestogen 4)	0,0028	277	0,78	0,67
3	Вода	0,945	25	23,625	6,48
4	Сахароза	1	90	90	24,72
Загалом				362,58	100

2. Собівартість визначають за формулою:

$$C = (M/Y) * 100,$$

де M - затрати на сировину і матеріали, грн.

Y — питома вага затрат на сировину і матеріали в собівартості продукції.

$$(Y = 71,8\%)$$

$$C = (362,58/71,8) * 100 = 504,99 \text{ грн.}$$

Ціна продукції визначається за формулою:

$$Ц = C * (1 + P/100),$$

де P - рентабельність, $P = 20\%$

$$Ц = 504,99 * (1 + 20/100) = 605,99 \text{ грн.}$$

3. Розрахунок вартості спожитої електроенергії для технологічних цілей визначається за формулою:

$$E_c = W * \Phi_c * T_p,$$

де E_c — вартість спожитої електроенергії, грн.

W — потужність електродвигунів використаного електрообладнання, кВт/год;

Φ_c — годинний фонд часу досліджень, год.

T_p — тариф кВт/год., грн.

Для магнітної мішалки $\Phi_c = 40$ год, $W = 0,8$ кВт/год, $T_p = 9,55$ грн/кВт*год

$$E_c = 40 * 9,55 * 0,8 = 305,6 \text{ грн.}$$

Витрати на електроенергію за три місяці становлять:

$$E_c = 305,6 * 3 = 916,8 \text{ грн.}$$

4. Розрахунок фонду заробітної плати.

У розробці лікарського засобу брали участь:

1. студент бакалавр з розміром заробітної плати 3000 грн.
2. науковий керівник з окладом - 80 грн/год, на роботу у лабораторії відведено 20 год.

№	Назва посуду	Кількість, шт.	Ціна однієї шт., грн.	Загальна вартість посуду, грн.
---	--------------	----------------	-----------------------	--------------------------------

$$\Phi_{\text{заг}} = (3000 \cdot 2 + 80 \cdot 20) = 7600 \text{ грн.}$$

За три місяці розробок:

$$\Phi_{\text{заг}} = 7600 \cdot 3 = 22800 \text{ грн}$$

Відрахування у соціальний фонд складають 22% від загального фонду заробітної плати:

$$\Phi_{\text{від}} = 7600 \cdot 0,22 = 1672 \text{ грн.}$$

За три місяці розробок:

$$\Phi_{\text{від}} = 1672 \cdot 3 = 5016 \text{ грн}$$

Загальний фонд заробітної плати сумарно з відрахуванням становить:

$$\Phi_{\text{заг+від}} = 7600 + 1672 = 9272 \text{ грн.}$$

Загальний фонд заробітної плати сумарно з відрахуванням за три місяці становить:

$$\Phi_{\text{заг+від}} = 5016 + 22800 = 27816 \text{ грн.}$$

5. Визначення вартості основних фондів і амортизаційних відрахувань

Вартість апаратури

Таблиця

15

№	Назва апаратури	Кількість, шт	Ціна одиниці апаратури, грн.	Загальна вартість апаратури, грн.
1	Магнітна мішалка	2	1850,00	3700,00
Загалом				3700,00
2	Невраховані витрати на апаратуру (15 %)			555,00
Загалом				4255,00

1.	Колба Бунзена 500 мл	1	95,00	95,00
2.	Колба круглодонна з трьома горловинами зі шліфом на 500 мл	1	295,00	295,00
3.	Чашка Петрі	5	24,00	120,00
4.	Колба з міткою і з шліфом на 500 мл	1	195,00	195,00
5.	Термометр лабораторний ртутний, 0-100 °С	1	200,00	200,00
6.	Лійки лабораторні 75/110	2	9,00	18,00
7.	Пробірки мірні без шліфа на 25 мл	5	15,00	75,00
8.	Фільтрувальний папір (1кг)	0,250	60,00	15,00
9.	Лійка ділильна на 500 мл	2	280,00	560,00
10.	Воронка для фільтрування	2	152,00	304,00
11.	Насадка для вловлювання	1	82,50	82,50
12.	Склянка хімічна висока з мітками ТС 100 мл	1	98,00	98,00
13.	Колба круглодонна зі шліфом ТС на 500 мл	2	180,00	360,00
Загалом				2417,50

Вартість лабораторного посуду

Таблиця 16

$$A = (C \cdot N_a \cdot K) / (100 \cdot T_{\text{еф}}),$$

де А — амортизаційні відрахування;

С — повна вартість обладнання;

N_a — норма амортизаційних відрахувань, $N_a = 15\%$;

К — кількість днів використання, $K = 20$;

$T_{\text{еф}}$ — ефективний фонд робочого часу, $T_{\text{еф}} = 200$ год.

$$A = ((4255 + 2417,5) \cdot 15 \cdot 20) / (100 \cdot 200) = 100,09 \text{ грн.}$$

За три місяці роботи $A = 100,09 \cdot 3 = 300,27$ грн.

6. Вартість оренди лабораторії.

Площа лабораторії – 45,6 м²;

Вартість оренди за 1 м² за місяць – 80 грн;

Ціна оренди за місяць = 80 * 45,6 = 3648 грн.

Вартість оренди за три місяці=3648*3=10944 грн.

7. Загальна вартість досліджень (табл. 17)

Загальна вартість досліджень

Таблиця 17

№	Витрати	Сума, грн
1	Вартість сировини і матеріалів	362,58
2	Вартість електроенергії	916,8
3	Фонд заробітної плати	22800
4	Соціальні внески	5016
5	Вартість апаратури	6672,5
6	Амортизаційні відрахування	300,27
7	Орендна плата за приміщення	10944
Загалом		47012,15
8	Накладні витрати (20% від прямих)	9402,43
Загалом		56414,58

Пробіотичний монокультурний лікарський препарат на основі *L. reuteri* може використовуватись для лікування коліків у дітей та залежно від штаму використовуватись для попередження розвитку остеопорозу у менопаузі, покращення стану ротової порожнини, зниження рівню холестерину.

Собівартість виготовлення 10 кг продукту у лабораторних умовах за три місяці складає 56414,58 грн, що є досить ефективно і доводить можливість виготовлення препарату у промислових умовах.

Висновки

1. Існує серйозна загроза для людського здоров'я від надмірного використання антибіотиків, що може проявлятися у різноманітних функціональних порушеннях шлунково-кишкового тракту, таких як дисбактеріоз, та порушеннях імунітету.
2. Для захисту людського організму треба намагатись використовувати максимально автохтонні види мікроорганізмів та вводити їх у харчові продукти та лікарські засоби, біологічно-активні добавки.
3. Вид *L. reuteri* на сьогоднішній день отримує все більше розповсюдження на ринку пробіотичних добавок через свій широкий спектр біологічної дії.
4. Було виділено та досліджено морфологію та фізіологію виду *L. reuteri* у лабораторних умовах. Морфологічна та фізіологічна характеристика відповідає описаній у літературних джерелах.
5. При досліджуванні зброджувальної активності *L. reuteri* було доведено, що цей вид є слабким кислотоутворювачем і не підходить для створення монокультуральних кисломолочних продуктів.
6. Існує можливість виробництва монокультурного лікарського засобу у формі «саше» на основі *L. reuteri*.

1. Дегтяренко Н. В., Шинкаренко Л. М., Дуган О. М. Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів. – Наукові записки. Т. 67. Біологія та екологія, 2007. – с. 30-36.
2. Янковский Д. С. Особенности отечественных мультипробиотиков / Д. С. Янковский, Р. А. Моисеенко, Г. С. Дымент // Современная педиатрия. – 2009. – № 3(25). – С. 79 – 86.
3. Державний реєстр лікарських засобів [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: <http://www.drlz.kiev.ua/>
4. Янковський Д. С., Дымент Г. С. Микрофлора и здоровье человека. – К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 22, 23, 25, 43 с.
5. Ширококов В. П. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом : [навч. посіб.] / В. П. Ширококов, Д. С. Янковський, Г. С. Димент. — К. : ТОВ «Червона Рута—Турс», 2008. — 312 с.
6. Микробная экологическая система человека и использование отечественных мультипробиотиков для профилактики и устранения ее нарушений у детей / Е. М. Лукьянова, Ю. Г. Антипкин, Д. С. Янковский, Р. А. Моисеенко, Г. С. Дымент // Современ. педиатрия. – 2009. – № 4 (26). – С.117 – 128.
7. Зайков С. В. Нарушения микробиоценоза кишечника: Всегда ли необходимы пробиотики? / С. В. Зайков // Рациональная фармакотерапия. – 2008. – № 2(07). – С.1 – 6.
8. Martin H. Floch, Yehuda Ringel and W. Allan Walker The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. – В.: Academic Press, 2017. – ch. 8, pg. 89-97
9. Phaik Lyn Oh, Andrew K. Benson, Daniel A. Peterson, Prabhu B. Patil, Etsuko N. Moriyama, Stefan Roos, Jens Walter Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. – J.: The ISME Journal, 2009. – pg. 377-378
10. Gabriela Sinkiewicz, Lennart Ljunggren Occurrence of *Lactobacillus reuteri* in human breast milk. – J.: Microbial Ecology in Health and Disease, 2008. – pg. 122-126.

11. Qinghui Mu, Vincent J. Tavella, Xin M. Luo Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. – J.: Frontiers in Microbiology, 2018 – Article 757.
12. Sara E. Jones, James Versalovic Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. – J.: BMC Microbiology, 2009.
13. T. C. Chung, L. Axelsson, S. E. Lindgren, W. J. Dobrogosz *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. – J.: Microbial Ecology in Health and Disease, 1989. – pg. 137-144.
14. L. T. Axelsson, T. C. Chung, W. J. Dobrogosz, S. E. Lindgren Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. – J.: Microbial Ecology in Health and Disease, 1989. – pg. 131-136.
15. Chengli Hou, Xiangfang Zeng, Fengjuan Yang, Hong Liu and Shiyan Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. – J.: Journal of Animal science and biotechnology, 2015 – pg. 6-14.
16. Todd L. Talarico, Walter J. Dobrogosz Chemical Characterization of an Antimicrobial Substance produced by *Lactobacillus reuteri*. – J.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1989. – pg. 674-679.
17. Maria P. Taranto, Jose L. Vera, Jeroen Hugenholtz, Graciela F. De Valdez, Fernando Sesma *Lactobacillus reuteri* CRL1098 Produces Cobalamin. – J.: American society for microbiology, 2003. – pg. 5643-5647
18. Gregor Reid The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. – J.: *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. – pg. 3673-3676
19. Monica Vicario , Antotio Santos , Deborah Violanti, Jose Nart, Lluís Giner Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: A preliminary randomized clinical trial. – J.: *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013. – pg. 813-819
20. Takao Mukai, Tomoko Asasaka, Eri Sato, Kenichi Mori, Mitsuyo Matsumoto, Hitoshi Ohori Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid

- receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. – J.: FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2002. – pg. 105-110.
21. Valerie Sung, Harriet Hiscock, Mimi L. K. Tang, Fiona K. Mensah, Monika L. Nation, Catherine Satzke, Ralf G. Heine, Amanda Stock, Ronald G. Barr, Melissa Wake Treating infant colic with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: double blind, placebo controlled randomized trial. – J.: The BMJ, 2014. – pg. 348-359.
22. Valerie Sung, Frank D`Amico, Michael D. Gabana, Kim Chau, Gideon Koren, Francesco Savino, Hania Szajewska, Girish Deshpande, Christophe Dupont, Flavia Indrio, Silja Mentula, Anna Partty, Daniel Tancredi *Lactobacillus reuteri* to Treat Infant Colic: A Meta-analysis. – J.: NCBI, 2018.
23. M. L. Jones, C. J. Martoni, S. Prakash Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. – J.: European Journal of Clinical Nutrition, 2012. – pg. 1234-1241
24. Robert A. Britto, Regina Irwin, Darin Quach, Laura Schaefer, Jing Zhang, Taehyung Lee, Narayanan Parameswaran, Laura R. McCabe Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. – J.: Journal of Cellular Physiology, 2014. – vol. 229, pg. 1822-1830
25. Розробка складу та технології таблеток-ядер комбінованого пробіотика / П. А. Гордієнко, В. І. Чуєшов, Р. О. Пашнєва // Фармаком. – 2009. – № 3. – С. 19 – 23.
26. Мікробіологічні та фармакологічні основи раціонального застосування антибіотиків: Посібник для студентів, викладачів медичних вузів та лікарів / К.А. Посохова, С.І. Климнюк – Тернопіль, Укрмедкнига, 1998. – 131 с.
27. Юкало В.Г. Лабораторний практикум з хімії та фізики молока і молочних продуктів : навчальний посібник / Юкало В.Г. – Тернопіль: Тернопільсь-

кий національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2018. – 176 с.

Анотація

З кожним роком зростає кількість людей з функціональними порушеннями шлунково-кишкового тракту та імунітету, що спричинено надмірним використанням антибіотиків широкого спектру дії. Для зменшення негативного впливу на людський організм рекомендовано споживання продуктів, лікарських препаратів, біологічних добавок, що містять пробіотичні мікроорганізми.

Особливу цінність серед різноманітних видів пробіотиків мають ті, що є автохтонними для людського організму. Найкращими для людського організму вважаються кисломолочні бактерії, оскільки вони є досить поширеними у природі, входять у склад нормальної мікробіоти шлунково-кишкового тракту та є антагоністами до багатьох видів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Одним з широко поширених видів не тільки для людини, а й деяких ссавців є *Lactobacillus reuteri*. Даний вид є не тільки одним з автохтонних для людського організму, а й проявляє широкий спектр біологічної дії і тим самим викликає промисловий інтерес.

Щороку дедалі більше виробників лікарських засобів починають використовувати цей вид у різноманітних лікарських засобах, тому існує необхідність впровадження цього виду у фармацевтичну промисловість України.

У даній роботі представлено по-етапне виділення, дослідження морфологічних та фізіологічних властивостей виду *L. reuteri* та проведена розробка експериментального лікарського монокультурного засобу у формі саше на основі даного виду.