

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему: «Оптимізація складу поживного середовища для
вирощування молочнокислих бактерій *Lactobacillus*
acidophilus»

Виконав: студент 2 курсу, групи МгБТ-21
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
високомолекулярних сполук
Владислав КОВАЛЕНКО
Керівник: к.т.н., доц. Ірина ВОЛОШИНА
Рецензент: к.б.н. Ігор ГРЕЦЬКИЙ

Київ 2022

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 2022 року

**ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Коваленко Владиславу Ігоровичу**

1. Тема роботи: **Оптимізація складу поживного середовища для вирощування молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus***

Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом закладу вищої освіти
від «28» вересня 2022 року № 180-уч.

2. Строк подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо оптимізації складу поживного середовища для вирощування молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus*; результати експериментів, які отримані у лабораторії під час роботи; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломної роботи (перелік питань, які потрібно розробити): вступ, огляд літератури, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки..

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Ім'я, прізвище та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	<i>Ірина ВОЛОШИНА, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра</i>	01.09.2022	07.10.2022
Розділ 2	<i>Ірина ВОЛОШИНА, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра</i>	01.09.2022	28.10.2022
Розділ 3	<i>Ірина ВОЛОШИНА, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра</i>	01.09.2022	01.11.2022

6. Дата видачі завдання 01.09.2022 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ	12.09.2022	
2	Розділ 1 Огляд літератури	07.10.2022	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	28.10.2022	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	01.11.2022	
5	Висновки	04.11.2022	
6	Оформлення дипломної магістерської роботи (чистовий варіант)	10.11.2022	
7	Здача дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____ Владислав КОВАЛЕНКО

Науковий керівник роботи _____ Ірина ВОЛОШИНА

Директор НМЦУПФ _____ Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Коваленко В.І. Оптимізація складу поживного середовища для вирощування молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus*. – Рукопис.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2022 рік.

У дипломній роботі проаналізовано сучасні літературні джерела стосовно методів оптимізації та накопичення молочної кислоти молочнокислими мікроорганізмами.

Дипломну магістерську роботу присвячено оптимізації поживного глюкозо-пептонного середовища для вирощування *Lactobacillus acidophilus*, з метою отримання накопичення біомаси, кількості життєздатних клітин, кількості виходу молочної кислоти та показника загальної кислотності. Оптимізацію поживного середовища проводили за допомогою повнофакторного експерименту по двом факторам – джерелу вуглецю та азоту. Після отримання результатів проводили корегування експерименту. Використовували сучасну програму ANOVA для статистичної обробки результатів.

Ключові слова: Lactobacillus acidophilus, оптимізація, молочна кислота, середовище, кислотність.

ABSTRACT

Kovalenko V.I. Optimizing the composition of the nutrient medium for growing lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus*. – Manuscript.

Master's thesis in specialty 162 – Biotechnology and bioengineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2022.

The diploma work analyzed modern literary sources regarding methods of optimization and accumulation of lactic acid by lactic acid microorganisms.

The master's thesis is devoted to the optimization of the nutrient glucose-peptone medium for the cultivation of *Lactobacillus acidophilus*, with the aim of obtaining the accumulation of biomass, the number of viable cells, the amount of lactic acid output and the indicator of total acidity. Optimizing the nutrient medium was carried out using a full factorial experiment on two factors - the source of carbon and nitrogen. After obtaining the results, the experiment was adjusted. A modern ANOVA program was used for statistical processing of the results.

Keywords: Lactobacillus acidophilus, optimization, lactic acid, environment, acidity..

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Оптимізація складу поживних середовищ	11
1.2 Методи оптимізації складу поживних середовищ.....	13
1.3 Застосування однофакторного експерименту.....	15
1.3.1 Експерименти з вилучення компонентів поживного середовища	15
1.3.2 Дослідження з внесенням добавок у поживне середовище.....	16
1.3.3 Експерименти із заміщенням компонентів поживного середовища	16
1.3.4 Зміна фізичних параметрів	16
1.4 Повний факторний експеримент	16
1.5 Дробовий факторний експеримент	17
1.6 Насичені плани Плаккет-Бермана.....	19
1.7 Конструкція Тагуті	24
1.8 Штучна нейронна мережа	25
1.9. Біосинтез молочної кислоти	27
1.9.1 Загальна характеристика молочної кислоти	27
1.9.2 Продуценти молочної кислоти	28
1.9.3 Основні методи отримання молочної кислоти	29
1.9.4 Використання <i>L. acidophilus</i> у промисловості	32
Висновки до розділу 1	33
РОЗДІЛ 2 МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ.....	35
2.1. Характеристика біологічного агента <i>Lactobacillus acidophilus</i>	35
2.1.1 Таксономічний статус <i>Lactobacillus acidophilus</i>	35
2.1.2 Морфолого-культуральні та фізіологічні властивості <i>Lactobacillus acidophilus</i>	35
2.2 Поживні середовища та умови культивування.....	37
2.2.1 Середовище МРС для культивування <i>Lactobacillus acidophilus</i>	37
2.2.2 Середовище ГПС для культивування <i>Lactobacillus acidophilus</i>	38
2.2.3 Методи аналізу отриманих зразків	38
2.2.4 Кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера	39
2.2.5 Визначення кількості біомаси методом спектрофотометричного дослідження	41
2.2.6 Визначення загальної кислотності проби методом титрування.....	41
2.2.7 Методика визначення живих клітин за методом Коха.....	42
2.2.8 Визначення молочної кислоти методом титрування.....	43
2.2.9 Статистичний аналіз.....	43
Висновки до розділу 2	46

РОЗДІЛ 3

3.1 Математична модель факторів для оцінки впливу	47
3.2 Аналіз отриманих результатів за накопиченням біомаси.....	48
3.1.3 Аналіз результатів за загальною кислотністю	52
3.1.4 Аналіз результатів за молочною кислотою	56
3.2 Математична модель факторів для оцінки впливу після корекції.....	60
3.2.1 Аналіз результатів після корекції за біомасою	61
3.2.2 Аналіз результатів після корекції за загальною кислотністю проби	66
3.2.3 Аналіз результатів після корекції за молочною кислотою	71
3.3 Математична модель факторів для оцінки впливу з додаванням сахарози	76
3.3.1 Аналіз результатів за біомасою з додаванням сахарози	77
3.3.2 Аналіз результатів за загальною кислотністю з додаванням сахарози	81
3.3.3 Аналіз результатів за молочною кислотою	84
Висновки до розділу 3	89
ВИСНОВКИ	90
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	91

ВСТУП

Методи оптимізації допомагають знизити загальну вартість продукту. Одним з чинників збільшення продуктивності є склад поживного середовища, котрий може бути оптимізований в індивідуальних умовах в залежно до вимог мікроорганізмів. Цього можливо домогтися, застосовуючи широкий діапазон методик від класичного "однофакторного" до сучасних статистичних та математичних методів. Кожен метод має свої переваги та недоліки, але, незважаючи на недоліки, деякі методи застосовуються для отримання найкращих результатів. Що може допомогти зробити біотехнологічну промисловість більш економічною та екологічно безпечною.

В дослідженні було запропоновано метод оптимізації складу поживного середовища для вирощування молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophillus*. Математичне планування експерименту дозволило при незначній зміні кількісного складу поживного середовища значно збільшити накопичення біомаси, підвищити вихід молочної кислоти і зростання показника загальної кислотності зразка.

Актуальність теми: оптимізація росту *Lactobacillus acidophillus* УКМ В-2691 на більш дешевому глюкозо-пептонному середовищі (ГПС) ніж МРС для досягнення максимальної кількості накопичення молочної кислоти, рівня біомаси та загальної кислотності.

Наукова новизна використання сучасних методів оптимізації та програм статистичних обрахунків.

Метою роботи є визначити оптимальної концентрації складових поживного середовища ГПС для культивування молочнокислих бактерій штаму *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 з одночасним вивченням впливу компонентів поживного середовища (джерела вуглецю та азоту) на накопичення біомаси, кількість виходу молочної кислоти, та показника загальної кислотності.

Об'єкт дослідження роботи – культура молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Предмет дослідження – використання методу повного факторного експерименту для оптимізації складу поживного середовища для культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Провести аналіз літературних джерел методів оптимізації складу поживних середовищ та шляхів отримання молочної кислоти за допомогою мікробного синтезу.

2. Побудувати матрицю планування повного факторного експерименту по двом факторам (джерело вуглецю та азоту) та визначити оптимальні умови культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 на середовищі ГПС для накопичення біомаси, кількості життєздатних клітин, кількості виходу молочної кислоти та показника загальної кислотності.

3. Провести статистичний аналіз даних за допомогою програми ANOVA.

Методи дослідження: біотехнологічні та біологічні методи, спостереження, спектрофотометричні, математичні та статистичні методи, аналіз та узагальнення результатів.

Практичне значення отриманих результатів полягає у оптимізації складу поживних середовищ для досягнення максимальної концентрації молочної кислоти за допомогою *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Публікації. Результати досліджень опубліковано в тезах збірників матеріалів науково-практичних конференцій та дві статті, які прийняті та будуть опубліковані .

Бібліографія опублікованих робіт включає:

1. Rohova M., **Kovalenko V.**, Tkachenko V., Lych I., Voloshyna I. Green biosynthesis of zinc nanoparticles //9th edition of the International Conference on Advanced Materials and Systems – ICAMS 2022 (Scopus), (додаток А).

2. Рогова М.Р., **Коваленко В.І.**, Зурнаджан А., Волошина І.М. Біосинтез наночасток титану за допомогою мікроорганізмів// стаття за результатами VII Міжнародної науково-практична інтернет-конференції «Технологічні та

біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» 24-25 листопада 2022 р., м. Харків (додаток Б).

3. Rohova M., **Kovalenko V.**, Shkotova L., Voloshyna I. Main properties of *Lactobacillus fermentum* //Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century. Abstracts book of the IV International Scientific Conference, September 22-23, 2022, Kyiv. – Kyiv, 2022. – P. 78 (додаток В).

4. Рогова М.Р., **Коваленко В.І.**, Волошина І.М. Використання наночасток оксиду титану та оксиду цинку як сонцезахисних фільтрів // XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2022», 10–11 жовтня 2022 року, Житомир, ПП «Євро-Волинь», 2022. – P. 226-229 (додаток Г).

5. Rohova M., **Kovalenko V.**, Shkotova L. V., Voloshyna I. M. Main properties of *Lactobacillus fermentum* //Наука, освіта, технології і суспільство: нові дослідження і перспективи: збірник тез доповідей міжнародної науково-практичної конференції (Полтава, 20 вересня 2022 р.): у 2 ч. Полтава: ЦФЕНД, 2022. Ч. 2. С. 37 (додаток Д).

Структура і обсяг магістерської роботи. Основна частина дипломної магістерської науково-дослідницької роботи викладена на 109 сторінках, і включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 66 найменувань публікацій вітчизняних та зарубіжних дослідників. В роботі представлено додатки, що ілюструють виконання індивідуального плану магістра, представлені на 10 сторінках.

РОЗДІЛ 1

1.1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Оптимізація складу поживних середовищ

Технологія ферментації активно використовується для виробництва різноманітних економічно важливих продуктів, які знаходять застосування в енергетиці, фармацевтичній, хімічній та харчовій промисловості. Незважаючи на те, що процеси ферментації застосовуються з глибини віків, необхідність сталого виробництва продуктів, що відповідають вимогам ринку та є економічно ефективними, висувають складні вимоги. Для будь-якого продукту, заснованого на ферментації, найважливішим є наявність ферментованого продукту, що відповідає ринковому попиту. Повідомляється, що різні мікроорганізми виробляють ряд первинних і вторинних метаболітів, але в дуже малих кількостях. Для того, щоб задовольнити ринковий попит, в минулому було відкрито кілька високопродуктивних методів, які були успішно впроваджені в різні процеси, такі як виробництво первинних або вторинних метаболітів, біотрансформація, видобуток олії тощо [1,2, 3].

Оптимізація середовища дотепер залишається одним з найбільш критично досліджуваних явищ, яке проводиться перед будь-яким широкомасштабним синтезом метаболітів, а також має багато проблем, пов'язаних з цим процесом. До 1970-х років оптимізація середовища здійснювалася класичними методами, які були дорогими, трудомісткими, вимагали великої кількості експериментів з недостатньою точністю. Проте, з появою сучасних математичних та статистичних методів, оптимізація середовища стала більш динамічною, ефективною, дієвою, економічною та надійною в отриманні результатів. Для проектування виробничого середовища необхідно визначити найбільш оптимальні умови ферментації (наприклад, рН, температура, швидкість перемішування тощо) та відповідні компоненти середовища (наприклад, вуглець, азот тощо) і відповідно оптимізувати їх. Далі, шляхом оптимізації

вищезазначених параметрів можна досягти максимальної концентрації продукту [4, 5, 6].

Збільшення продуктивності приводить до зменшення собівартості продукту, відповідно і витрат на його виробництво, що є однією з найважливіших тем для досліджень. Зазвичай, підвищення продуктивності можна досягти або за рахунок поліпшення штаму, або за рахунок оптимізації параметрів процесу. Але вдосконалення штаму та оптимізація – це ситуація в якій не можливе покращення тільки за рахунок одного параметру. Не можливо вибрати провідний штам, поки не маєте найкращого середовища, і ви не можете запропонувати найкраще середовище, поки не маєте провідного штаму. Зазвичай, дослідники в усьому світі вирішують цю проблему, дотримуючись одного компоненту за раз. Однак обидві стратегії не можуть гарантувати, що один із штамів буде кращим, якщо буде використано інше середовище. Враховуючи цей недолік були запропоновані і досліджені різні нові методи, в яких одночасно можна проводити як розробку середовища, так і поліпшення штаму.

Дослідження з оптимізації середовищ зазвичай проводяться в хімічній, харчовій та фармацевтичній промисловості з метою підвищення виходу та активності бажаного продукту. Нині існує дуже мало знань про роль факторів, їх рівні в контролі виробництва метаболітів різними штамми. З метою підвищення продуктивності метаболітів дослідники вивчали потреби в поживних речовинах для виробництва вторинних метаболітів і виявили, що потреби в поживних речовинах змінюються від штаму до штаму [7, 8]. Кількість і якість доступних поживних речовин та здатність до їх успішного засвоєння є основними факторами, що визначають природу мікроорганізмів та їх метаболічну активність. Таким чином, при оптимізації середовища необхідно враховувати, що для отримання максимального виробництва метаболітів необхідно задовольнити мінімальну потребу мікроорганізму в зростанні. У процесі ферментації, коли процес переходить до отримання хімічних речовин з

низькою вартістю та більшим об'ємом, постає питання максимізації ефективності та мінімізації виробничих витрат і відходів побічних продуктів, щоб ефективно конкурувати з традиційними методами [8].

1.2 Методи оптимізації складу поживних середовищ

Серед методів, що застосовуються для оптимізації складу середовищ, виділяють повний факторний експеримент, метод дробових повторень, насичені плани Плассета-Бермана, композиційні плани та метод крутого сходження з поверхнею відгуку [9, 10].

Початок планування експерименту було закладено працями англійського математика Р. Фішера (1935 р.), де було обґрунтовано переваги застосування на першому етапі досліджень факторного ортогонального планування експериментів, де варіюються лише два рівні. У такому випадку застосування дробового факторного плану суттєво скорочує число потрібних експериментів [11].

Якщо математична модель, одержана методом повного та дробового факторного експерименту, є неадекватною, це означає, що дослідник перебуває в області високої кривизни поверхні відгуку. Для складання математичних моделей, які характеризують область високої кривизни поверхні відгуку, застосовують плани другого порядку. При цьому використовуються ортогональне, центральне композиційне планування та ротаційне планування [12].

При цьому ротаційне планування дозволяє отримати більш точний математичний описання в порівняно з ортогональним центральним композиційним плануванням. Це досягнуто за допомогою підвищення кількості експериментів в центрі плану і спеціального вибору розміру зоряного плеча [12].

Англійські хіміки Бокс і Вільсон запропонували метод крутого підйому, чи руху по градієнту, що дозволив найкоротшим чином знайти координати

екстремуму досліджуваного процесу. Для математичного опису екстремальної області використовуються різні методи планування експерименту, засновані на представленні екстремальної області поліномами другого порядку, які адекватно описують досліджуваний процес [13].

До таких планів відноситься план Бокса-Бенкена – один з видів статистичних планів, що застосовуються при плануванні наукових і, особливо, промислових експериментів. Ці плани дають змогу отримати максимальну кількість об'єктивної інформації про дію досліджуваних факторів на виробничий процес при використанні найменшої кількості спостережень. Вони належать до симетричних некомпозиційних трирівневих планів другого порядку і є комбінацією дворівневого $(-1, +1)$ повного факторного експерименту з неповністю блочним збалансованим планом. Де область планування є гіперкубом, а кожен з факторів набуває значень на трьох рівнях: $-1, 0$ і $+1$. Плани Бокса-Бенкена по ряду статистичних характеристик перевершують ортогональні та ротаційні плани центральної композиції, які широко використовуються в промисловому експерименті [13].

Для вирішення широкого кола задач оптимізації складу багатокомпонентної суміші використовується метод симплекс-гатчастого (центроїдного) планування [12].

Для дослідження промислового процесу використовується еволюційне планування експерименту, де дослідник повинен постійно пристосовуватися до мінливих умов виробництва. Специфічним є планування з відсівом експериментів [13].

Сучасна теорія експериментального планування була створена в 1960-х роках. Її методи близькі до теорії апроксимаційних функцій та математичного програмування [13].

1.3 Застосування однофакторного експерименту

У традиційному методі оптимізації середовища – однофакторних експериментах – за один раз змінюється лише один фактор або змінна, а інші змінні залишаються постійними. Потім концентрації обраних компонентів середовища змінюються в бажаному діапазоні. Через свою простоту і зручність однофакторний експеримент був найпопулярнішим вибором серед науковців для проектування складу середовища і застосовувався на перших етапах у різних сферах. Ця методологія залишається актуальною і на сьогоднішній день, на етапі початкової розробки складу середовища для культивування нового метаболіту або відомої сполуки з нового вихідного матеріалу.

Як і будь-яка інша методика, даний метод оптимізації середовища має свої суттєві переваги та недоліки. Головною перевагою є простота, за допомогою якої можна виконати серію дослідів і провести аналіз результатів за допомогою простих графіків без використання високотехнологічних програм статистичного аналізу. Основним негативним моментом є труднощі в оцінці "взаємодій" експериментів, зважаючи на те, що це розкидана послідовність експериментів [14, 15], витрачений час та витрати, пов'язані з аналізом великої кількості змінних, як основні недоліки методів. У цій методології іноді оптимальна точка може бути повністю пропущена, тому для визначення оптимального рівня потрібна велика кількість експериментів, що стає трудомістким, довготривалим та економічно неефективним у більшості випадків [14]. Тим не менш, методика однофакторного експерименту може бути найкращим інструментом скринінгу, коли про змінні нічого не відомо, завдяки своїй простоті та зручності.

1.3.1 Експерименти з вилучення компонентів поживного середовища

У даному типі експерименту всі компоненти середовища послідовно видаляються з поживного середовища, і після відповідного інкубаційного періоду досліджується їх вплив на виробництво вторинного метаболіту або

продукту, що становить зацікавленість, з урахуванням відповідних параметрів. Так наприклад повідомлялося, що під час виробництва протигрибкової сполуки з *Streptomyces caroatus*, видалення соєвого шроту, гліцерину або NaCl з ферментаційного середовища знижувало вихід на 20-40% [15].

1.3.2 Дослідження з внесенням добавок у поживне середовище

Експерименти з внесенням добавок зазвичай проводяться для оцінки впливу різних вуглецевих та азотних добавок на продукування метаболітів. Під час дослідження виробництва протигрибкових препаратів із *Streptomyces violaceusniger* спостерігалось підвищення виходу на 70-90% при додаванні до поживного середовища ксилози, сорбіту та гідроксилу проліну. Аналогічно, гліцерин і пептон були визнані найбільш придатними джерелами вуглецю та азоту для виробництва протигрибкових та антибактеріальних метаболітів із *Streptomyces rimosus* в умовах зануреної ферментації [16].

1.3.3 Експерименти із заміщенням компонентів поживного середовища

Для розробки складу середовища джерела вуглецю та азоту, які показують посилення ефекту на виробництво бажаного метаболіту в експериментах із заміщення, як правило, намагаються використовувати як цілісне джерело вуглецю та азоту.

1.3.4 Зміна фізичних параметрів

На додаток до хімічних і біологічних змінних, деякі дослідники використовували експерименти однофакторного експерименту для стандартизації фізичних параметрів, таких як рН, температура, перемішування і вимоги до аерації в процесі ферментації [17].

1.4 Повний факторний експеримент

Сучасні статистичні методи надають нам потужні інструменти для оцінки впливу компонентів або змінних на основі результатів експерименту. Таким чином, експерименти повинні бути сплановані належним чином з достатнім обсягом вибірки для отримання адекватних даних, необхідних для максимально

ефективного вирішення поставленої задачі. Такі типи методик прийнято називати повно факторним експериментом. У повному факторному експерименті випробовуються всі комбінації факторів, наприклад, рН, штам, компоненти середовища, температура тощо. Якщо ми маємо справу з k факторами, кожен з яких може встановлюватися на g рівнях, то для того, щоб здійснити повний факторний експеримент необхідно поставити $n = g^k$ дослідів. Найбільшого поширення набули експерименти, в яких фактори варіюються на двох рівнях, тобто експерименти типу 2^k . Планування, проведення та обробка результатів складається з таких етапів:

- вибір залежних і незалежних змінних (факторів);
- кодування незалежних (вхідних) чинників; складання план-матриці експерименту;
- рандомізація дослідів (їх реалізація у випадковому порядку); реалізація плану експерименту;
- розрахунок і оцінка значимості коефіцієнтів моделі;
- перевірка адекватності отриманої моделі [12].

На відміну від цього, при частковому факторному аналізі відбираються і тестуються лише кілька добре описаних комбінацій. Зазвичай частковий факторний аналіз проводиться, коли повний факторний аналіз неможливий, а знання про взаємодію компонентів середовища для конкретного штаму є обмеженими або відсутніми.

1.5 Дробовий факторний експеримент

Мета і умови проведення дробово факторного експерименту, а також методика обробки отриманих результатів повністю співпадають з повно факторним експериментом. Дробовий факторний експеримент застосовують у випадках великої кількості факторів ($n > 3$), що дозволяє суттєво скоротити обсяг експериментальних досліджень. ДФЕ є частка ($1/2, 1/4, \dots$) від ПФЕ, яку називають дробовою реплікою і позначають 2^{n-p} – (при $p=1$ – напіврепліка,

при $p=2$ – чверть репліка і т. д.). Скорочення кількості дослідів веде до появи кореляції між деякими стовпчиками матриці планування, що не дозволяє окремо оцінювати вплив факторів та їх взаємодії на вихідну змінну (так звані змішані оцінки). Тому головною умовою застосування таких планів є апіорна інформація про відсутність або дуже слабкий вплив деякої взаємодії факторів, що дає змогу використати відповідний стовпчик матриці планування під додатковий фактор. Наприклад, якщо в структуру регресійної моделі повинні входити три фактори і апіорі відомо, що взаємодія x_1x_2 не впливає на y , то можливо побудувати план таблицю,

Таблиця 1.1.

Матриця планування дробового факторного експерименту

№	X_0	X_1	X_2	$X_3=X_1X_2$	Y
1	+	+	+	+	Y_1
2	+	-	+	-	Y_2
3	+	+	-	-	Y_3
4	+	-	-	+	Y_4

в якому стовпчик x_1x_2 буде відданий під x_3 . Кількість дослідів такого плану дорівнює $N = 2^{3-1} = 2^2 = 4$.

Співвідношення, що показує, яка із взаємодій прийнята незначущою і тому замінена на додатковий фактор, називається генеруючим співвідношенням. В даному випадку генеруючим співвідношенням є $x_3=x_1x_2$. З останнім співвідношенням можна виконувати алгебраїчні дії – домножуючи обидві частини рівняння на фактори та їх взаємодії. При цьому використовується правило: якщо в результаті отримуємо фактор в парній степені, то він замінюється одиницею ($x_1^{2n} = 1; n = 1, 2 \dots$). Домноживши генеруюче співвідношення наведеного прикладу на x_3 , отримуємо $x_3^2=x_1x_2x_3$, або $1 = x_1x_2x_3$. Останнє співвідношення називається визначальним контрастом, формально воно задає елементи для стовпчика фіктивного фактору x_0 .

Якщо почергово домножити визначальний контраст на кожний з факторів, отримаємо співвідношення, які визначають змішані оцінки для обраної дробової репліки [13]:

$$x_1 = x_1^2 \cdot x_2 \cdot x_3 = x_2 \cdot x_3; \quad (1.1)$$

$$x_2 = x_1 \cdot x_2^2 \cdot x_3 = x_1 \cdot x_3; \quad (1.2)$$

$$x_3 = x_3 \cdot x_2 \cdot x_3^2 = x_1 \cdot x_2; \quad (1.3)$$

А саме:

$$b_1 \rightarrow \beta_1 + \beta_{23}; \quad (1.4)$$

$$b_2 \rightarrow \beta_2 + \beta_{13}; \quad (1.5)$$

$$b_3 \rightarrow \beta_3 + \beta_{12} \quad (1.6)$$

1.6 Насичені плани Плакетт-Бермана

Надзвичайно важливо, щоб фактори, які не роблять внеску, були виключені з дослідження на якомога більш ранній стадії. У 1946 році R.L. Plackett і J.P. Burman опублікували свою роботу під назвою "Планування оптимальних багатофакторних експериментів" як рішення для визначення основних ефектів з більш високою точністю в будь-якому процесі. Дизайн Плакетта-Бурмана (PBD) – це дворівневий дизайн, який є дуже корисним для економічного виявлення основних ефектів і припущення, що всі інші взаємодії є незначними при порівнянні деяких важливих основних ефектів, тобто, коли немає взаємодій, спостерігається ефект одного фактора, який може бути перевершений або недооцінений іншими факторами [18].

Плакетт і Берман розробили сувору математичну теорію побудови та аналізу ортогональних планів. Зокрема, було доведено, що в насиченому плані обчислені за методом найменших квадратів оцінки ефектів мають максимальну для цієї кількості дослідів N точність, однакову для всіх ефектів, якщо матриця планування має ортогональні стовпці. Щоб матриця була ортогональною, необхідно і достатньо, щоб:

1) кожен фактор зустрічався на кожному своєму рівні одне й те саме число разів;

2) кожен два фактори з будь-якою комбінацією їх рівнів зустрічалися те саме число разів;

3) кількість дослідів ділилося на квадрат числа рівнів, тобто виконується умова:

$$N = nl^2 \quad (1.7)$$

де n – ціле число.

При такому формулюванні умов ортогональності проблема побудови ортогональної матриці (плану експерименту) перетворюється на суто комбінаторну проблему.

Якщо $N = nl^2$ то число факторів, ефекти яких можна обчислити при даному N визначається за формулою:

$$k = (nl^2 - 1)/(l - 1) \quad (1.8)$$

Якщо кількість рівнів для всіх факторів дорівнює двом, то завдання побудови оптимального плану зводиться до побудови ортогональної матриці, що складається з $+1$ і -1 , розміру $N \times N$, де N -число, кратне чотирьом, тобто $N = 4n$. Максимальна кількість факторів, яку можна ввести в планування, причому до $K=N-1$. Для побудови насичених планів для $k=11, 19, 23$ та 35 скористаємося рядками з табл. 1.2.

Таблиця 1.2

**Комбінація знаків, що використовуються
при побудові насичених планів для $k=11, 19, 23, 35$**

k	N	Комбінація знаків
11	12	+++++----+
19	20	++-++++-+-+-----++-
23	24	+++++--++-++-+-+-----
35	36	-+-++++-++++-++++-+- -----++-

При побудові плану для $k=11$ як елементи першого стовпця береться рядок з таблиці №. Другий стовпець отримуємо з першого, замінивши в ньому перший елемент на останній і зрушивши відповідно вниз всі інші елементи. Третій стовпець отримуємо, замінивши у першому стовпці перші два елементи на останні і зрушивши вниз інші елементи і т. д. Елементами останнього рядка є - 1. Аналогічним образом будуються плани для $k=19, 23$ і 35 . Для $k=27$ під час побудови матриці планування використовуються три блоки А, В і С, наведені в таблиці 1.3. Ці блоки виписуються в порядку кругової перестановки за формул № і до них знову додається рядок, всі елементи якого - 1.

Таблиця 1.3

Блоки для побудови насиченого ортогонального плану для $k=27$

А	В	С
+-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+	+-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+	+-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+
+-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+	+-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+	+-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+ +-----+-----+-----+

Плакетт та Берман показали, як можуть бути побудовані насичені плани $N=100$ при N , кратному 4 (за винятком $N=92$). Застосування планів Плакетта - Бермана дозволяє отримувати окремі оцінки лінійних ефектів всіх факторів з максимально можливою при цьому числа дослідів точністю, однаковою всім ефектів. Будь-який коефіцієнт лінійного рівняння регресії визначається за формулою:

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} y_i. \quad (1.9)$$

Похибка у визначенні коефіцієнтів рівняння регресії b_j при цьому визначається за формулою:

$$S_{bj} = \frac{S_{\text{відТВ}}}{\sqrt{N}} \quad (1.10)$$

де $S_{\text{відТВ}}$ - помилка виміру.

Оскільки матриця планування ортогональна, така оцінка лінійних ефектів збігається з оцінкою, отриманою за методом найменших квадратів. Крім того, внаслідок ортогональності матриці одержані оцінки лінійних ефектів не змішані між собою.

Ставлення b_j до $S_{\text{відТВ}}$ має розподіл Стюдента для нульгіпотези, тобто справжнього значення $b_j = 0$. Це можна використовувати для перевірки значущості ефектів. Для перевірки значущості відмінності між ефектами можна використовувати відношення:

$$t = \frac{b_u - b_j}{S_{\text{аіні}\delta} \sqrt{2}/\sqrt{N}} \quad (1.11)$$

За відсутності паралельних дослідів для оцінки $\delta_{\text{оспр}}$ можна використовувати ефекти так званих уявних факторів. Уявні фактори вводяться, якщо план ненасичений, тобто $k < N - l$. При цьому вільним стовпцям матриці планування можна поставити у відповідність деякі уявні фактори та підрахувати їх ефекти за загальним правилом, як для дійсних факторів. Ці ефекти відрізняються від нуля за рахунок помилки у вимірі у та неврахованих ефектів взаємодії. Якщо $b_{k+1}, b_{k+2}, \dots, b_{N-1}$ - ефекти уявних факторів, то величина S_{bj} служить оцінкою квадратичної помилки у визначенні ефектів головних факторів:

$$S_{bj}^2 = (b_{k+1}^2 + b_{k+2}^2 + \dots + b_{N-1}^2) \frac{1}{N-k-1} \quad (1.12)$$

А дисперсія відтворюваності є оцінкою квадратичної помилки у вимірі відгуку, якщо вважати, що ефекти взаємодії відсутні:

$$S_{\text{аіні}\delta}^2 = N(b_{k+1}^2 + b_{k+2}^2 + \dots + b_{N-1}^2) \frac{1}{N-k-1} \quad (1.13)$$

Плани Плакетта-Бермана є часом більш економними планами проти дробовими репліками для даної розмірності факторного простору[19].

Плани Плакетта-Бермана є надійним методом оцінки відносної вагомості різних змінних або компонентів середовища для конкретного результату, наприклад, виробництва антибіотиків або інших клітинних метаболітів [20, 21, 22, 23]. Застосування Плани Плакетта-Бермана значно зменшує загальну кількість експериментів [24], оскільки не враховуються ефекти взаємодії змінних, а відбираються лише ті змінні, які дійсно впливають на виробництво потрібного метаболіту. Для виробництва гамма-інтерферону з використанням плани Плакетта-Бермана було досліджено 20 компонентів середовища лише в 24 прогонах, і спостерігалось підвищення виробництва на 45%[25]. Аналогічно, під час початкових досліджень оптимізації середовища для виробництва антибактеріальних метаболітів із *Streptomyces* sp, ми використовували плани Плакетта-Бермана для визначення найбільш ефективних компонентів у середовищі і повідомили, що соєвий шрот, карбонат кальцію та фосфат калію можуть значно збільшити виробництво антибіотиків [26].

Незважаючи на те, що плани Плакетта-Бермана є хорошим методом для ідентифікації важливих компонентів, існують деякі недоліки, пов'язані з його ефективністю. Плани Плакетта-Бермана слід використовувати лише тоді, коли фактори не взаємодіють між собою або мають лише адитивний вплив на результат, інакше результати аналізованого фактору будуть посилені або замасковані іншими факторами, оскільки він не може інтерпретувати, чи залежить вплив одного фактору від іншого фактору. Тим не менш, в Міністерстві енергетики, плани Плакетта-Бермана є відправною точкою, і його слід використовувати для визначення переліку подальших експериментів. З огляду на це, плани Плакетта-Бермана зазвичай називають "скринінговими планами", оскільки вони допомагають відсіяти фактори, що не впливають на врожайність, тобто на підвищення врожайності, від факторів, що впливають на неї.

1.7 Конструкція Тагучі

Для того, щоб вирішити проблеми, пов'язані з методом PBD, доктор Генічі Тагучі розробив методику, яка базується на "Ортогональному маршруті". Даний метод дозволяє визначити, як різні параметри впливають на врожайність на невеликій кількості експериментів, замість тестування всіх можливих комбінацій, як, наприклад, при багато факторному плануванні. Метод Тагучі пропонує три етапи автономного контролю якості, такі як системна стратегія, проектування параметрів та фаза проектування допуску [27]. Системна структура дозволяє знайти експериментальні рівні проектних характеристик, проектування параметрів показує факторний рівень і забезпечує першочергові ефекти процесу, в свою чергу, фаза проектування допусків покращує елементарні допуски, які суттєво впливають на формування продукту [28]. Такий дизайн допомагає визначити фактори, що суттєво впливають на продукт, з мінімальною кількістю експериментів, тим самим заощаджуючи час та ресурси. Дисперсійний аналіз на зібраних даних планування експериментів може бути використаний для підбору нових значень параметрів з метою оптимізації експлуатаційної характеристики. При виконанні експерименту спочатку вибирається загальна ступінь свободи з подальшим підбором стандартного ортогонального масиву. В кінці експерименту фактори присвоюються відповідним стовпчикам. Він аналізує основний ефект і взаємодію двох факторів. При цьому взаємодії вищих порядків вважаються незначними. Шум, тобто неконтрольовані змінні експерименту, береться як фокусна точка для аналізу. Неконтрольовані змінні (шуми), як правило, є причиною втрати якості. Цей вплив шуму можна усунути, використовуючи методологію Тагучі [29].

Метод Тагучі стає дуже корисним при вимірюванні якості за відхиленням функціональної характеристики від її цільового значення. Підхід Тагучі є повністю розробленим методом, перевагою якого є економія експериментального часу, вартості продукту та покращення якості, що є

основною вимогою для оптимізації будь-якого процесу ферментації[30]. Растосували статистичний підхід Тагучі на першому етапі для оптимізації виробництва нової термостабільної поліпептидної антибактеріальної сполуки з *Geobacillus pallidus* за різних умов виробництва, таких як період інкубації, температура, рН, швидкість аерації, концентрація азоту та вуглецю [31].

1.8 Штучна нейронна мережа

Штучна нейронна мережа – це математична обчислювальна модель, на яку впливають структурні та функціональні аспекти біологічних нейронних мереж. Нейронні мережі, як правило, застосовуються в задачах оцінки та багатокрокового прогнозування, але також можуть використовуватися як контролери безпосередньо або як регулятор будь-якого параметра процесу для звичайного контролера. Штучна нейронна мережа імітує здатність мозку до навчання [32] і складається з вхідних даних (наприклад, синапсів), які множаться на ваги (силу відповідних сигналів), а потім обчислюються за допомогою математичної функції, яка визначає активацію нейрона. У більшості випадків штучна нейронна мережа являє собою адаптивну систему, яка змінює свою структуру відповідно до зовнішньої або внутрішньої інформації, що проходить через мережу під час фази навчання. Вони просто "тренуються" з використанням набору даних, а потім застосовуються для прогнозування нових точок даних. Попередні знання або рівняння не є важливими для цього навчання, оскільки мережа і система залишаються для користувача "чорним ящиком". Важливими характеристиками штучної нейронної мережі є те, що вони можуть безперервно працювати з великими обсягами даних, досягають успіху в розпізнаванні складних образів і не вимагають механістичного опису системи [33]. Штучна нейронна мережа добре підходить для середнього дизайну, оскільки генерує велику кількість даних, які часто містять приховані закономірності. Архітектура складається з трьох шарів інформації, відомих як нейрони: шар "вхідних" одиниць з'єднаний з шаром "прихованих" одиниць,

який далі з'єднаний з шаром "вихідних" одиниць. "Умови навчання" нейронних мереж поділяються на групи. Керовані (асоціативні), де нейронна мережа навчається шляхом надання їй вхідних та вихідних експериментальних даних. Некеровані (самоорганізація), в яких вихідна одиниця навчається реагувати на кластери шаблонів у вхідних даних. На відміну від керованого, тут немає попереднього набору груп, в які повинні бути класифіковані зразки; скоріше система повинна розробити своє власне представлення вхідних стимулів. Підкріплення, де навчання може розглядатися як проміжна форма двох вищезгаданих класів навчання. Система, що навчається, класифікує свою дію як хорошу або погану на основі реакції навколишнього середовища і відповідно коригує свої параметри. Як правило, коригування параметрів продовжується до досягнення рівноважного стану.

Штучна нейронна мережа з великим успіхом застосовуються для проектування, моделювання, оптимізації та управління системами, головним чином завдяки їх здатності навчатися фільтрувати зашумлені сигнали та узагальнювати інформацію за допомогою систематичної процедури навчання [34, 35]. Методи оптимізації є переважно загальними і можуть застосовуватися в різних процесах ферментації з однаковою ефективністю. Було використано метод для оптимізації реактора поживного туману для вирощування волохатих коренів і розроблено ефективну модель для оптимізації умов культури, а також ефективно спрогнозовано продуктивність біомаси за різних умов вирощування культури [36]. В іншому дослідженні комбінація штучної нейронної мережі та генетичного алгоритму була застосована для максимізації нативної концентрації та терміну зберігання білка аспартат- β -семіальдегіддегідрогенази [37].

Нейронна мережа може працювати на завданнях, які мають нелінійні програми або залежності. Коли елемент нейронної мережі виходить з ладу, навіть тоді вона може продовжувати працювати без проблем завдяки своїй паралельній природі [35]. Вона може бути без проблем впроваджена в будь-яку

програму і не потребує перепрограмування. Існують певні обмеження нейронних мереж, наприклад, вони потребують належного навчання для ефективної роботи. В штучній нейронній мережі якість вхідних даних для навчання визначає якість вихідних даних.

1.9. Біосинтез молочної кислоти

1.9.1 Загальна характеристика молочної кислоти

Молочна (2-гідрокси-пропанова) кислота є гідроксильованою карбоновою кислотою. Вона існує у двох діастереоізомеричні формах: L(+) - і D(-) -молочна кислота. Також молочна кислота є проміжний продуктом обміну живих організмів. Відкрита 1780 року шведським хіміком Карлом Шееле [38].

Являє собою кінцевий продукт молочнокислого бродіння, яке проходить при прокисанні цукровмісних речовин (молоко, сік рослин тощо). У м'язових клітинах тварин утворюється (+)-молочна кислота внаслідок безкисневого гліколізу, ферментативного розкладу глікогену під час скорочення м'язів. Накопичення в організмі молочної кислоти обумовлює біль та втому в м'язах. Особливістю метаболізму молочної кислоти у тварин є те, що вона з м'язів може транспортуватись до печінки, де в присутності кисню та затратах енергії відновлюватись до глюкози, яка в свою чергу транспортується в м'язи та відновлюється до глікогену (цикл Корі).

Молочну кислоту використовують у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості як діючу та допоміжну речовину. Входить до складу фармацевтичних препаратів, косметичних засобів, напоїв та харчових продуктів як регулятор рН, підкиснювач та консервант. У складі лікарських препаратів для місцевого застосування, застосовують як пом'якшувач шкіри та охолоджувач у концентрації 0,015–6,6%, у виробництві біодеградуючих полімерів[39].

Провідні американські, західноєвропейські та японські фірми, що випускають харчову продукцію, акцентують увагу на тому, що молочна

кислота – надійний природний консервант, вона поліпшує смак готових виробів, профілактично діє й лікує деякі захворювання шлунка й кишечника, заміняє оцтову й лимонну кислоти. За рубежом простежується тенденція до широкого використання молочної кислоти замість оцтової.

1.9.2 Продуценти молочної кислоти

Молочнокислі бактерії прийнято називати мікроорганізмами які здатні ферментувати вуглецевмісні субстрати з утворенням молочної кислоти. Вони об'єднані в родину *Lactobacillaceae*. Це сімейство бактерій є грампозитивними, не утворюють спор за рідкісним винятком і переважна більшість нерухомі. Крім того, майже всі молочнокислі бактерії не є суворими анаеробами, а характеризується аеротолерантністю. Відповідно сім'я *Lactobacillace* включає наступних представники: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* і *Weisella*. З усіх цих родів мікроорганізмів Лактобактерії є найбільш значним, включає близько 80 видів, що виробляють молочну кислоту [40]. Найбільш відомі види лактобактерій: *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus maltoromicus* і *Lactobacillus salivarius*. Такі види, як *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus jensenii* і *Lactobacillus acidophilus* виробляють D-молочну кислоту одночасно та суміші двох стереоізомерів [40]. Комерційну цінність мають ті штами, які витримують високі концентрації молочної кислоти при збереженні продуктивності, і які можуть бути піддані генно-інженерним модифікаціям для селективної продукція D- або L-молочної кислоти [41]. Представники родини *Lactobacillaceae* використовуються в харчовій промисловості і не є патогенними або умовно-патогенними, не містять гемопротеїнів і активного дихального ланцюгу транспорту електронів, але, незважаючи на це, вони можуть рости в наявності атмосферного кисню, оскільки будучи анаеробами, вони ще є аеротолерантними. Проте деякі молочнокислі бактерії, наприклад, представники роду *Lactobacillus plantarum* і *Lactobacillus casei* містять гени, що

кодують синтез ферменти аеробного дихання, і здатні переключатися на аеробне дихання при додавання до живильного середовища гемовмісних компонентів [42, 43, 44]. При відсутності каталази захист від активних форм, що утворюються в аеробних умовах кисень забезпечується пероксидазами, NADH: H_2O_2 оксидазою, Mn-вмісними псевдокаталаза [45]. Оптимальні умови вирощування залежать від виду. Більшість із лактобактерій мезофіли (рН 5,5–6,5, температура 30–40°C). Однак є також психрофіли (зростання при 3 °C) і термофіли, здатні рости при 45-62°C [41]. Недоліки проведення промислових процесів бродіння з використанням молочнокислих бактерій є:

- а) вимогливість до наявності в середовище факторів росту;
- б) неможливість вирощування на простих синтетичних середовищах;
- в) максимальна активність досягається тільки в дуже вузькому діапазоні рН (від 5,5 до 6,5); г) під час бродіння необхідно нейтралізувати отриману молочну кислоту, вона пригнічує ріст і біосинтез. Зазвичай з додаванням $CaCO_3$, $Ca(OH)_2$, NH_4OH , що призводить до отримання відповідної солі молочної кислоти. Все перераховані вище обставини здорожують бродіння і ізоляцію молочної кислоти.

1.9.3 Основні методи отримання молочної кислоти

Молочну кислоту отримують двома шляхами: хімічним та мікробіологічним синтезом. Молочна кислота синтезована хімічним шляхом дешевша в виробництві, проте отримання біотехнологічним шляхом має певні переваги, а саме виробництво більш чистого продукту, з мінімальною кількістю шкідливих домішок та можливість напрямлення на синтез певного ізомеру, наприклад, L(+), що неможливо для хімічного синтезу та значно дешевше ніж технічно складне розділення суміші ізомерів, до того ж є швидшим та більш екологічним [46].

Традиційно при виробництві молочної кислоти використовують періодичний метод культивування. Періодичне культивування є найпростішим і найбільш легко керованим технологічним процесом, так як джерело вуглецю та

інші складові живильного середовища не вносяться під час самого процесу, а закладаються у ферментер до його запуску. Виняток становить тільки нейтралізуючий агент, що застосовується для підтримки сталого показника рН. Такий метод володіє певними перевагами: низькою вірогідністю контамінації та відносно високими концентраціями готової продукції (КП) у порівняно з іншими способами культивування [47].

Але, з іншого боку, періодичне культивування відрізняється низькими концентраціями біомаси, а також невисокою продуктивністю внаслідок можливого інгібування процесу як субстратом, так і кінцевим продуктом. Для усунення цих недоліків широко використовуються інші методи культивування, такі як: періодичне культивування, культивування з рециркуляцією біомаси та безперервне культивування. Однак, кожний з цих методів має певні недоліки, і їх подальша розробка все ще триває. Багато уваги приділяють питанням досягнення ефективного отримання молочної кислоти. Досягти високої продуктивності виробництва молочної кислоти дозволяють методи культивування з використанням високої щільності клітин шляхом їх іммобілізації або організації процесу з рециркуляцією біомаси. Окрім того, сучасні досягнення в галузі інтегрованих мембранних систем забезпечують основу для подальших удосконалень у біотехнологічному виробництві молочної кислоти [48].

Підбір мікроорганізму для промислових цілей здійснюється залежно від виду джерел вуглецю та від продуктивності обраного штаму [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. Ферментативне одержання молочної кислоти переважає над її синтетичним виробництвом. Обираючи штам молочнокислих бактерій, що виробляє лише один із ізомерів молочної кислоти, можливо отримати оптимально чистий продукт. Для росту і розвитку мікроорганізмів потрібне джерело вуглецю. Всі мікроорганізми, включаючи *Lactobacillus acidophilus*, засвоюють глюкозу. Цей специфічний мікроорганізм також засвоює сахарозу, тому м'яса є найбільш придатною сировиною. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*

метаболізує лактозу, але не засвоює сахарозу. Найкращою сировиною для нього є молочна сироватка. *L. casei ssp. rhamnosus* та *Lactobacillus helveticus ssp. rhamnosus* засвоюють як глюкозу, так і лактозу. Крім того, для цих двох штамів найбільш придатною сировиною є молочна сироватка. *L. delbrueckii ssp. lactis* метаболізує глюкозу, лактозу та сахарозу. Крохмаль являється ще одним перспективним потенційним джерелом вуглецю. Від способу гідролізу залежить вибір штаму. При гідролізі за допомогою солодових α - і β -амілаз в результаті утворюється переважно мальтоза. Мікроорганізмами *L. delbrueckii ssp. lactis*, деякі штами *L. delbrueckii ssp. delbrueckii* здатні засвоювати мальтозу. При застосуванні α -амілази та глюкоамілази результатом є глюкоза та деякі глюкозоолігосахариди. У цьому випадку підходять штами, згадані вище. Штами *Lactobacillus amylovarus* і *Lactobacillus amylophilus* гідролізують крохмаль і одночасно зброджують його до молочної кислоти.

Крохмальну сировину можуть зброджувати деякі види пліснявих грибів, наприклад, *Rhizopus sp.*, а найчастіше – *Rhizopus oryzae* [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. Другим важливим органогенним компонентом є азот. Як органічні, так і неорганічні речовини (NH_3 , NH_4OH , $(NH_4)_2SO_4$) використовуються як джерела азоту для молочнокислого бродіння. Органічними джерелами азоту є дріжджі дріжджовий екстракт, м'ясний екстракт, пептон, солодові коренеплоди. Амінокислоти та вітаміни групи В необхідні для біосинтезу молочної кислоти. При наявності біотину в недостатній кількості, бактерії потребують інших амінокислот. У середовища, багаті на біотин, немає потреб в інших амінокислотах. Так у середовища, багаті на біотин також, не потрібно додавати аспартат. Аналогічна залежність існує між фолієвою кислотою (вітамін В9) і синтезом молочної кислоти.

Існує кілька незамінних амінокислот, специфічних для кожного представника молочнокислих бактерій. Обов'язковим є додавання до раціону додавання в середовище мінеральних солей, оскільки вони слугують джерелам макро- і мікроелементів. До них відносяться $MgSO_4$, $MnSO_4$ та $FeSO_4$. Фосфор

необхідний для розвитку молочнокислих бактерій. Жирні кислоти також впливають на розвиток молочнокислих бактерій, хоча механізми їх впливу ще недостатньо вивчені [50, 51].

1.9.4 Використання *L. acidophilus* у промисловості

Lactobacillus acidophilus є основним комерційним видом молочнокислих бактерій, доступний в продуктах включаючи молоко, йогурти та дитячі суміші, а також у дієтичних добавках з пробіотичними ефектами [55, 56].

Він є частиною багатьох невизначених заквасок для сквашування молока, процесу консервування, розробленого в епоху раннього неоліту і використовувався у виробництві традиційних ферментованих продуктів більше 10 000 років. Його повільне зростання в молоці означає, що більша частина ферментації в молочних продуктах досягається за допомогою йогуртової закваски (наприклад, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* і *Streptococcus thermophilus*), а згодом додається *L. acidophilus* для отримання додаткової пробіотичної цінності.

Lactobacillus acidophilus застосовується в таких препаратах як «Ацидофлора», «Віта Баланс 3000», «Лінекс» та «Пробіо форте».

Висновки до розділу 1

Найважливішою стадією у виробництві бактеріальних препаратів на основі молочнокислих бактерій є отримання максимального виходу біомаси за мінімальний термін культивування. Культивування молочнокислих бактерій ускладнено особливостями поживних потреб цих мікроорганізмів. Для цих бактерій необхідна наявність у поживному середовищі факторів росту – амінокислот, вітамінів, мікроелементів тощо, тому питання оптимізації умов культивування бактерій є актуальним [57].

Оптимізація середовища передбачає проведення великої кількості експериментів незалежно від обраного середовища, що пов'язано з трудовими витратами і є відкритим експериментом. Рідко дані, отримані в колбах для шейкерування, точно збігаються з результатами досліджень у ферментері [58, 59]. Всі дослідження з використанням колб страждають від чотирьох основних недоліків: неможливість контролювати рН, погана здатність до перенесення кисню, неадекватне перемішування і значне випаровування під час процесу. Широко поширена думка, що найкраще середовище, отримане при культивуванні в колбах, буде найкращим середовищем у ферментері. На жаль, в цьому напрямку було проведено не так багато ретельних досліджень щодо порівняння характеристик середовища в різних масштабах [60]. Крім того, середовище промислового масштабу зазвичай страждає від таких проблем, як мінливість від партії до партії, доступність протягом усього року, коливання ціни, стабільність під час транспортних витрат, проблеми, пов'язані зі зберіганням навалом і часом.

Мікроби або клітини є динамічними за своєю природою з великою кількістю механізмів внутрішнього контролю, але більшість досліджень з оптимізації носіїв розглядають їх як "чорний ящик" або використовують виключно для отримання емпіричних даних. Ми вважаємо, що наступне покоління методів оптимізації поживних середовищ повинно враховувати механізм регуляції метаболічних шляхів. Мало того, навіть швидкість мутацій,

які виникають в конкретному середовищі під впливом компонентів середовища, також повинна бути врахована, оскільки вони можуть збільшити або зменшити врожайність або продукт, який нас цікавить. Мутантні штами також повинні бути досліджені в роботах з оптимізації середовища, оскільки вони можуть дати шлях до розробки нового процесу, де використане абсолютно нове дешеве середовище.

Найважливішим є те, що різні оптимізаційні дослідження зосереджені на ферментації на основі рідких культур, але не існує таких широких методів, доступних для методів ферментації у твердому або напівтвердому стані. Майже всі дослідники на тому чи іншому етапі стикаються з проблемою "коли слід припинити застосування подальших методів оптимізації або який етап є кінцевою точкою оптимізаційних досліджень". Проектування ферментаційного середовища може бути нескінченною проблемою, оскільки кінцева точка, наприклад, вихід, є довільною величиною, яка залежить від різних інших факторів. Більшість експертів у цій галузі завжди шукають нові компоненти або середовища для підвищення врожайності.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ

2.1. Характеристика біологічного агента *Lactobacillus acidophilus*

Було використано ліофілізований штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 дані для наукових досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Штами належать до Української колекції мікроорганізмів.

2.1.1 Таксономічний статус *Lactobacillus acidophilus*

Царство: Бактерій

Тип: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Lactobacillales*

Родина: *Lactobacillaceae*

Рід: *Lactobacillus*

Вид: *acidophilus*

2.1.2 Морфолого-культуральні та фізіологічні властивості *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus – це комерційно значущий вид бактерій, спочатку виділений з шлунково-кишкового тракту людини і позначений як *Bacillus acidophilus* в 1900 році. Протягом розвитку методів ідентифікації зазнала численних таксономічних переглядів і зараз є типовим видом філогенетичної підгрупи у дуже різноманітному та гетерогенному роді *Lactobacillus*. В результаті обмежень диференціації фенотипічно подібних видів морфологічними та біохімічними методами та ревізійного характеру таксономії *Lactobacillus*, описуючи *L. acidophilus*, доводилося стикатися з помилковою ідентифікацією та спотворенням інформації. На противагу цьому, завдяки своєму глобальному використанню в якості пробіотичної добавки у функціональних продуктах харчування, *L. acidophilus* як така є одним з найбільш добре охарактеризованих видів лактобактерій [61].

Lactobacillus acidophilus – це коротка (2-10 мкм) грампозитивна паличка, яка оптимально росте при температурі від 37 до 42 °С і спроможна рости при температурах до 45 °С [62]. Вид досягає найвищих темпів росту в слабнокислому середовищі з рН 5,5-6,0, а нижче рН 4,0 ріст припиняється [63]. Це облігатний гомоферментатор, що виробляє молочну кислоту в результаті ферментації вуглеводів і є однією з найменш вибагливих до кисню лактобактерій [64]. Вивчення біосинтетичних шляхів, закодованих в його геномі, показало, що *L. acidophilus* є ауксотрофним відносно 14 амінокислот і, не здатний синтезувати численні кофактори та вітаміни, включаючи рибофлавін, вітамін В6, нікотинат, нікотинамід, біотин і фолати [62]. Ці дефіцити анаболічної здатності ілюструються необхідністю використання поживних середовищ, багатих на поживні речовини, таких як запропоновані Де Маном, Рогоза и Шарпом (MPC) агар для його стандартного культивування. *Lactobacillus acidophilus* утворює щонайменше два морфотипи колоній при вирощуванні за стандартних умов культивування на агарі MPC, які називаються шорсткими та гладкими колоніями.

При мікроскопічному дослідженні зазвичай виявляються скручені або пухнасті волокнисті виступи з темною волокнистою масою в центрі колонії. Глибинні колонії мають неправильну форму з променевими або відгалуженими виступами. Вони не мають характерного забарвлення. Пептидоглікан клітинної стінки представлений тейхоевою, ліпотейхоевою, ліпоглікановою, тейкуроновою кислотами, а також містить вторинний полімерний бар'єрний шар між мікроорганізмом та його екологічною нішею. Між білком S-шару і лоуїном досягається синергічний ефект, який інгібує ріст і спричиняє лізис патогенних бактерій, як грампозитивних, так і грамнегативних [65].

Клітинні стінки не містять помітних гексоз і пентоз. Крім того, деякі штами мають додаткову мембрану в клітинній стінці, яка називається білковим S-шаром або поверхневим шаром. Штами демонструють серологічну різноманітність і не дають групових реакцій. Наявність ацетатної або

мевалонової кислоти, рибофлавіну, кальцію пантотенату, ніацину та фолієвої кислоти сприяє росту бактерій. Зазвичай вони не потребують ціанобаламіну, тіаміну, піридоксалу і тимідину [65].

2.2 Поживні середовища та умови культивування

Для культивування штамів *L. acidophilus* підходить низка поживних середовищ [66]. Класичним елективним живильним середовищем для вирощування термофільних лактобацил, включаючи *L. acidophilus*, є середовище МРС [67], а селективним середовищем для виділення та обліку оральних і фекальних лактобацил - лактобакагар [68]. Для визначення потреби в окремих компонентах поживного середовища під час культивування продуцентів використовували глюкозо-пептодне середовище. В якому змінювали джерела, та кількісний склад компонентів.

2.2.1 Середовище МРС для культивування *Lactobacillus acidophilus*

Середовище МРС виглядає як гомогенний сипучий порошок жовтого забарвлення. Готове поживне середовище бурштинового кольору, прозоре чи слабо опалесціюче. Якщо до рідкого середовища додати агар, утворюється гель.

Спосіб приготування: 65,15 г середовища розмішати в 1000 мл дистильованої води. Прокип'ятити до повного розчинення крупинок. Стерилізувати автоклавуванням при 1,1 атм (121 °С) впродовж 15 хв. Охолодити до 45-50°С. Перемішати і розлити в стерильні чашки Петрі, пробірки або флакони.

Склад МРС поживного середовища, г/л

Дріжджовий екстракт	5,0
М'ясний екстракт	10,0
Пептон	0,0
Глюкоза	20,0
Твин 80	1,0
К2НРО4	2,0

Ацетат натрію	5,0
Діамоній Цитрат	2,0
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ xH ₂ O	0,05
Вода дистильована	до 1000,0 мл
pH	6,2 – 6,5

2.2.2 Середовище ГПС для культивування *Lactobacillus acidophilus*

Якісний склад глюкозо-пептонного живильного середовища (ГПС) є поживною основою для росту бактерій, забезпечуючи їх всіма необхідними речовинами, глюкоза включена як джерело вуглецю, що дозволяє накопичувати широкий спектр мікроорганізмів. Пептон містить жири, метали, солі, вітаміни та багато інших органічних речовин необхідних для росту.

Спосіб приготування: змішати всі компоненти, кип'ятити протягом 1-2 хв до повного розчинення часточок. Фільтрувати через ватно-марлевий фільтр, розлити по 5 мл у стерильні пробірки з поплавцями. Стерилізувати автоклавуванням при 1,1 атм (121 °С) впродовж 15 хв. Охолодити до 45-50°С. Перемішати і розлити в стерильні чашки Петрі, пробірки або флакони.

За основу було взято такий склад, г/л

Глюкоза	10,0
Пептон	5,0
NaCl	5,0
Вода дистильована	до 1000,0 мл

2.2.3 Методи аналізу отриманих зразків

Для дослідження отриманих зразків були застосовані такі методи аналізу:

- Кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера;
- Визначення кількості біомаси методом спектрофотометричного дослідження;
- Визначення загальної кислотності проби методом титрування;
- Визначення молочної кислоти методом титрування;

– Методика визначення живих клітин висівом на чашки Петрі.

2.2.4 Кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера

Молочна кислота під час нагрівання з сірчаною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, взаємодіючи з гідрохіноном, утворює сполуку червоно-коричневого кольору, кількість якої піддається спектрофотометричному визначенню.

Для аналізу готуються пробірки за схемою, наведеною в табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

Приготування проб для першого етапу аналізу

	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Дистильована вода	6,0	6,0
Зразок	1,0	–
Розчин молочної кислоти	–	1,0
Ортофосфорна кислота	1,0	1,0

Пробірки перемішували та інкубували протягом 2-3 хвилин при температурі 20°C. Проінкубовані зразки фільтрували через паперовий фільтр. До пробірок з фільтратами додали реагенти за схемою наведено в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Приготування проб для другого етапу аналізу

	Дослідна проба	Контрольна проба
25%-вий розчин сульфату міді, мл	1,0	1,0
Сухий гідроксид кальцію, мг	0,5	0,5

Вміст пробірок активно перемішали. Інкубування проходить за кімнатної температури протягом 5 хв.



Рис 2.1 Інкубування проб після додавання гідроксиду кальцію.

Після інкубування проб вміст пробірок фільтрували через паперовий фільтр. Та готували нові пробірки за схемою наведеною в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Приготування проб для третього етапу аналізу

	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Фільтрат	1,0	1,0
10%-вий розчин сульфату міді	0,1	0,1
Концентрована сірчана кислота	4,0	4,0

Проби помістили на кип'ячу водяну баню на 1,5 хвилин та охолодили. Після цього, в кожен пробірку додали по 0,1 мл 20%-го спиртового розчину гідрокінону та вміст перемішали. Проби кип'ять 15 хвилин на водяній бані. Отримані проби дослідили методом спектрофотометрії при довжині хвилі 540 нм. Розрахунок концентрації молочної кислоти в біологічному матеріалі проводили за формулою:

$$C = \frac{C_{ст.} E_{досл.}}{E_{ст.}} \quad (2.1)$$

$C_{ст.}$ – концентрація молочної кислоти у стандартному розчині, мг/мл ;

$E_{ст.}$ – оптична щільність стандартного розчину молочної кислоти, одиниці оптичної густини;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби, одиниці оптичної густини;
 C – концентрація молочної кислоти в дослідній пробі, мг/мл.

2.2.5 Визначення кількості біомаси методом спектрофотометричного дослідження

Аналізуючи отримані зразки на приріст біомаси, використовували УФ-спектрофотометр ULAB 102 UV. Оптичну щільність досліджуваних зразків вимірювали при довжині хвилі 540 нм. Контролем слугувала дистильована вода.

Перед здійсненням виміру дотримувалися вимог правил експлуатації обладнання та було проведено калібрування приладу за допомогою функції автоматичного калібрування.

2.2.6 Визначення загальної кислотності проби методом титрування

Активність кислотоутворення визначають титриметричним методом. За основу було взято кислотно-основне титрування (метод нейтралізації), що базується на реакції переносу протонів від однієї часточки у розчині до іншої. Алкаліметричне титрування, визначення речовини титруванням стандартним розчином сильної основи. З зразків відібрали 1 см³ суспензії та титрували за допомогою 0,01 N розчину гідроксиду натрію за наявності кислотно-основного індикатора фенолфталеїну до появи слабо рожевого забарвлення (рис 2.1).



Рис 2.1 Визначення загальної кислотності титруванням.

Визначення показника активності кислотоутворення визначається в мг/л і обчислюється за формулою (2.2).

$$C = \frac{V \times N \times E}{1000 \times V_p} \quad (2.2)$$

C – кислотність, мг/л;

V (NaOH) - об'єм гідроксиду натрію, що пішов на титрування, мл;

N (NaOH) - нормальність гідроксиду натрію;

V_p – об'єм проби, мл;

E – еквівалент молочної кислоти (90,08).

2.2.7 Методика визначення живих клітин за методом Коха

Суть метода полягає в висіві певного об'єму досліджуваної суспензії мікроорганізмів на тверде середовище в чашки Петрі і підрахунку колоній, що виростають після інкубації посівів. Прийнято рахувати, що кожна колонія – потомство однієї клітини. Робота за цим методом включає такі три етапи, як приготування розведень, посів на тверде середовище в чашки Петрі і підрахування колоній, що виростають.

Для посію середовище зважується, розводиться водою, переміщується та автоклавується. Після чого розливається у стерильні чашки Петрі і залишається до повного застигання. Потім ставиться на добу у термостат. Після чого готове для посівів. Для посіву стерильною піпеткою наносили певний об'єм відповідного розведення, заздалегідь ретельно перемішаного, на поверхню поживного середовища в чашці Петрі. Цей об'єм розподіляли по поверхні середовища стерильним шпателем. Готові чашки з культурою поміщали у термостат на 37°C та вирощували упродовж 48 год.

Колонії підраховують, не відкриваючи чашки Петрі. Після того, як культура виросла колонії рахують (рис 2.2). Обрахунок може бути усіх колоній, що виросли на чашці та враховують розведення культури. Якщо виросла велика кількість колоній, то можна виділити на чашці 1 см³ та обрахували кількість колоній у ньому. Після чого помножити на площу чашки та врахувати розведення. Всі отримані дані були внесені у протокол. Результати паралельних посівів підсумовано і визначено середнє число колоній.

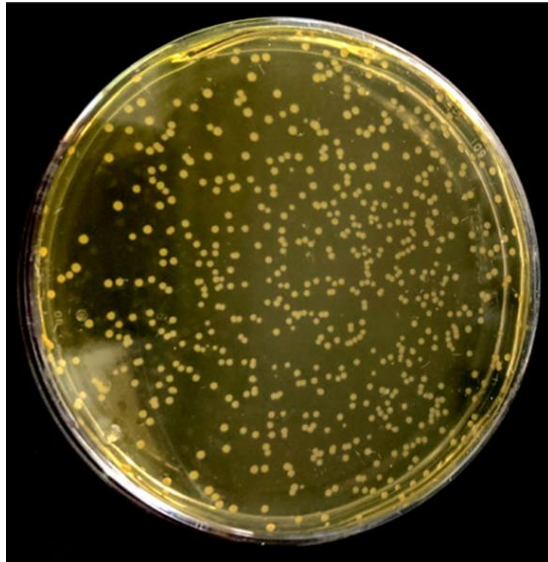


Рис 1.3 Підрахунок кількості живих колоній *Lactobacillus acidophilus*

2.2.8 Визначення молочної кислоти методом титрування

Кількість молочної кислоти визначено методом нейтралізації. Із проб відбирали 1 см³ суспензії і титрували 0,01 Н розчином натрію гідроксиду в наявності кислотно-основного індикатора фенолфталеїну до виникнення слабо-рожевого забарвлення.

Визначення показника кількості молочної кислоти визначається в мг/л і обчислюється за формулою (2.3)

$$C = \frac{V \times N \times E}{1000 \times V_p} \quad (2.3)$$

C – кислотність, мг/л;

V (NaOH) - об'єм гідроксиду натрію, що пішов на титрування, мл;

N (NaOH) - нормальність гідроксиду натрію;

V_p – об'єм проби, мл;

E - еквівалент молочної кислоти (60,1).

2.2.9 Статистичний аналіз

Дослідження проводилися в двох та трьох повторах. Одержані результати статистично опрацьовували загальноприйнятими методами варіаційної за критерієм Стьюдента.

Розрахунки, графіки, гістограми виконували з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel 2013.

Накопичення біомаси *L. acidophilus* оцінювали використовуючи методи регресіонного аналізу в теорії планування експерименту по повнофакторному плану 3^2 .

Для оцінки лінійних і квадратичних ефектів впливу факторів (X_1, X_2) на показник Y і висловити у вигляді рівняння регресії:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n + \sum_{j>1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (2.4)$$

де a_0 – константа,

a_i – лінійний коефіцієнт,

a_{ii} – квадратичний коефіцієнт,

a_{ij} – коефіцієнт взаємодії другого порядку.

Статистична обробка даних планованого експерименту (розрахунок коефіцієнтів регресії, дисперсійний аналіз (ANOVA) і побудова поверхонь відгуку проводилась з застосуванням тріал-версії програми Statistica (TIBCO Software Inc., <https://www.tibco.com/>) з використанням бібліотеки DOE.

Отримані коефіцієнти вважалися статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Активне планування експерименту припускає проведення дослідів відповідно до плану експерименту. План експерименту визначає розташування дослідних точок у факторному просторі (просторі незалежних змінних). План експерименту задається у вигляді матриці плану, наприклад у вигляді таблиці, кожен рядок якої відповідає умовам досвіду, а стовпець – значенням незалежної змінної в кожному досліді.

Матриця планування експерименту за планом ПФЕ наведена у табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Матриця планування експерименту за двома факторами

№	Рівні факторів оптимізації		Параметр оптимізації
	X1	X2	
1	-1	-1	Y1
2	+1	+1	Y2

Таблиця 2.5

Матриця планування експерименту за планом повнофакторного експерименту

№	Рівні факторів оптимізації		Параметр оптимізації
	X1 (глюкоза)	X2 (пептон)	
1	-1	-1	Y1
2	-1	0	Y2
3	-1	+1	Y3
4	0	-1	Y4
5	0	0	Y5
6	0	+1	Y6
7	+1	-1	Y7
8	+1	0	Y8
9	+1	+1	Y9

Висновки до розділу 2

В якості матеріалу для дослідження застосовано ліофілізований штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691, який надано для наукових досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для культивації *Lactobacillus acidophilus* використовувалися такі поживні середовища: ГПС (глюкозо-пептонне середовище) та МРС (Ман, Рогоза, Шарпа).

Lactobacillus acidophilus – нерухома пряма безспорова паличка довжиною 2-10 мкм, зазвичай розміром 0,6-0,9x1,5-6 мкм. Найбільш сприятливими умовами для розвитку даних мікроорганізмів є температура 37-42 °С та рН 5,5-6,0.

При вивченні досліджуваних проб були використані такі методики аналізу, як кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера, спектрофотометричне дослідження приросту біомаси, визначення загальної кислотності проби титруванням.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Математична модель факторів для оцінки впливу

Як фактор оптимізації було обрано 2 компонента, а саме глюкоза та пептон. За зміни яких могло б забезпечуватися збільшення рівня накопичення біомаси, підвищення виходу об'єму молочної кислоти та зростання загальної кислотності проби.

Дослідження проводили за планом повного факторного експерименту 3^2 . План експерименту, а також варіанти поєднання факторів приведені в табл. 3.1 та 3.2 відповідно.

Таблиця 3.1

Фактори математичної моделі

Фактори	Рівні факторів		
	L (-1)	0	H (+1)
Концентрація глюкоза (X_1)	5	10	15
Концентрація пептон (X_2)	2	5	10

Таблиця 3.2

Матриця планування експерименту за планом ПФЕ

№	Рівні факторів оптимізації		Параметр оптимізації
	Глюкоза (X_1)	Пептон (X_2)	
1	5	2	Y_1
2	5	10	Y_2
3	5	5	Y_3
4	10	2	Y_4
5	10	5	Y_5
6	10	10	Y_6
7	15	2	Y_7
8	15	10	Y_8
9	15	5	Y_9

Примітка: X_1 – концентрація глюкози, г/л, X_2 – концентрація пептону, г/л.

3.2 Аналіз отриманих результатів за накопиченням біомаси

План експерименту з вивчення змін накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus*, а також варіанти поєднання чинників та отримані результати наведені в табл. 3.3

Таблиця 3.3

Матриця результатів планування експерименту за кількість біомаси

варіант	Глюкоза (X ₁)	Пептон (X ₂)	NaCl	кількість біомаси		
				1	2	середнє
варіант 1	5	2	5	0,484	0,293	0,3885
варіант 2	5	10	5	1,107	1,058	1,0825
варіант 3	5	5	5	0,101	0,898	0,4995
варіант 4	10	2	5	0,566	0,737	0,6515
варіант 5	10	5	5	1,185	1,138	1,1615
варіант 6	10	10	5	1,207	1,214	1,2105
варіант 7	15	2	5	0,64	0,777	0,7085
варіант 8	15	10	5	1,242	1,324	1,283
варіант 9	15	5	5	1,147	1,185	1,166
MRS				1,424	1,441	1,4325

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація пептону, г/л.

Рівень значущості ефектів (лінійних, квадратичних і ефектів взаємодії) визначали методом дисперсійного аналізу (ANOVA), який показав, що концентрація пептону має достовірний ($p \leq 0,05$) вплив на приріс біомаси *Lactobacillus acidophilus*.

Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсного аналізу (рис 3.1)

ANOVA: Var Biomass ; R-sqr=.9116; Adj.:.76426 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ([No active dataset]) in Voloshina2_biomass) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=.0275724 DV: Biomass					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Glucose L+Q	0.270484	2	0.135242	4.90499	0.113334
(2)Peptone L+Q	0.562658	2	0.281329	10.20328	0.045886
1*2	0.008583	1	0.008583	0.31129	0.615822
Error	0.082717	3	0.027572		
Total SS	0.935706	8			

Рис 3.1 Результати дисперсійного аналізу (ANOVA)

Примітка:

L - Лінійні ефекти фактора;

Q - Нелінійні (квадратичні) ефекти фактора;

«*» - позначення поєднаної дії декількох факторів.

Для візуальної оцінки на рис 3.2 представлена діаграма Парето, на якій ефекти розташовані по спадаючій абсолютній величині значень. Дана діаграма показує, що максимальним достовірним впливом володіє лінійна концентрація пептону, а мінімальним – лінійний ефект поєднаних факторів глюкози та пептону.

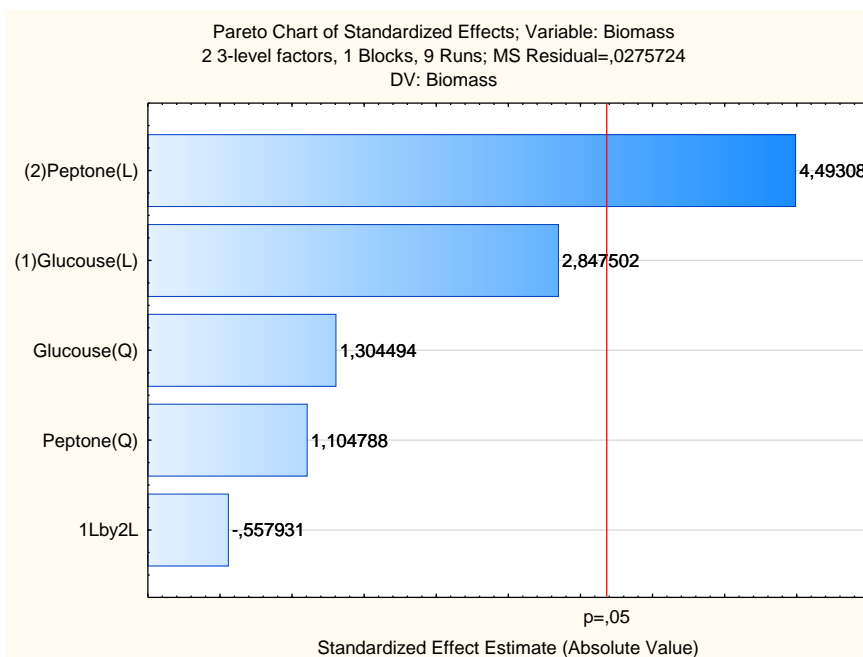


Рис 3.2 Вплив досліджуваних факторів на приріст біомаси (глюкоза та пептон). У ході аналізу вихідних даних отримано рівняння регресії, яке має вигляд полінома з урахуванням тільки статистично достовірних ефектів: $Y = 0.93 + 0.61 X_2$ (рис 3.3)

Effect Estimates; Var.: Biomass ; R-sqr=.9116; Adj. 76426 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ((No active dataset)) in Voloshina2_biomass) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=.0275724 DV: Biomass										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0.931104	0.055637	16.73524	0.000465	0.754041	1.108167	0.931104	0.055637	0.754041	1.108167
(1)Glucose(L)	0.388026	0.136269	2.84750	0.065243	-0.045642	0.821693	0.194013	0.068134	-0.022821	0.410847
Glucose(Q)	0.153167	0.117415	1.30449	0.283119	-0.220499	0.526832	0.076583	0.058707	-0.110250	0.263416
(2)Peptone (L)	0.609167	0.135579	4.49308	0.020575	0.177695	1.040639	0.304583	0.067789	0.088847	0.520319
Peptone (Q)	0.131062	0.118631	1.10479	0.349901	-0.246476	0.508601	0.065531	0.059316	-0.123238	0.254300
1L by 2L	-0.091694	0.164346	-0.55793	0.615822	-0.614717	0.431329	-0.045847	0.082173	-0.307359	0.215665

Рис 3.3 Оцінка ефективності накопичення біомаси у вигляді рівняння регресії

З отриманої моделі виходить, що концентрація пептону виявилась найбільш важливим фактором, зі збільшенням якого приріст біомаси *Lactobacillus acidophilus* повинна лінійно збільшуватися.

Оптимальні значення для приросту біомаси концентрація глюкози становить 10 г/л, пептону 5,667 г/л(рис. 3.5).

Згідно поверхні відгуку приросту біомаси *Lactobacillus acidophilus* від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон) (рис. 3.4) негативний вплив має зменшення концентрації пептону в поживному середовищі.

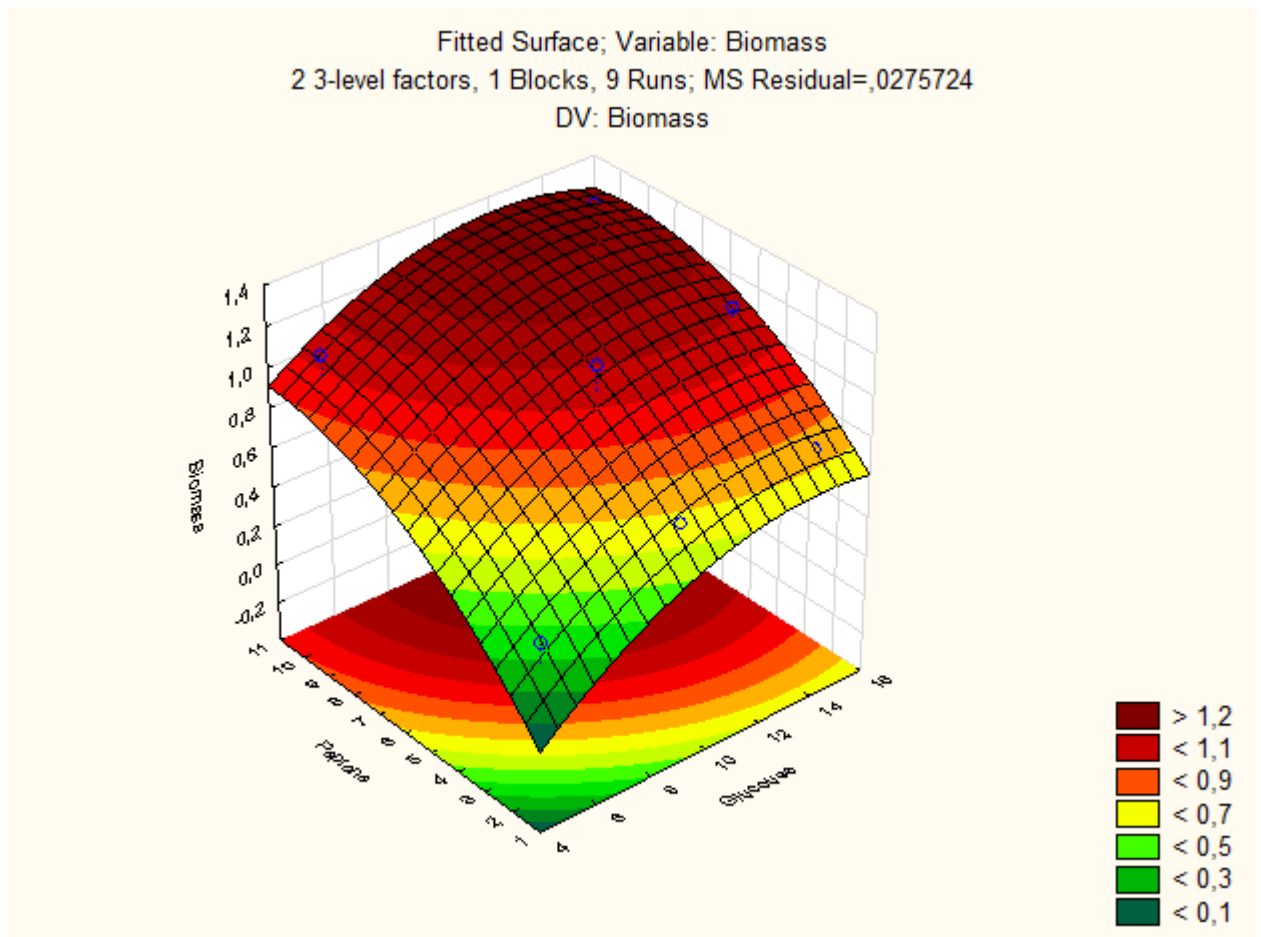


Рис 3.4 Поверхня відгуку приросту біомаси від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

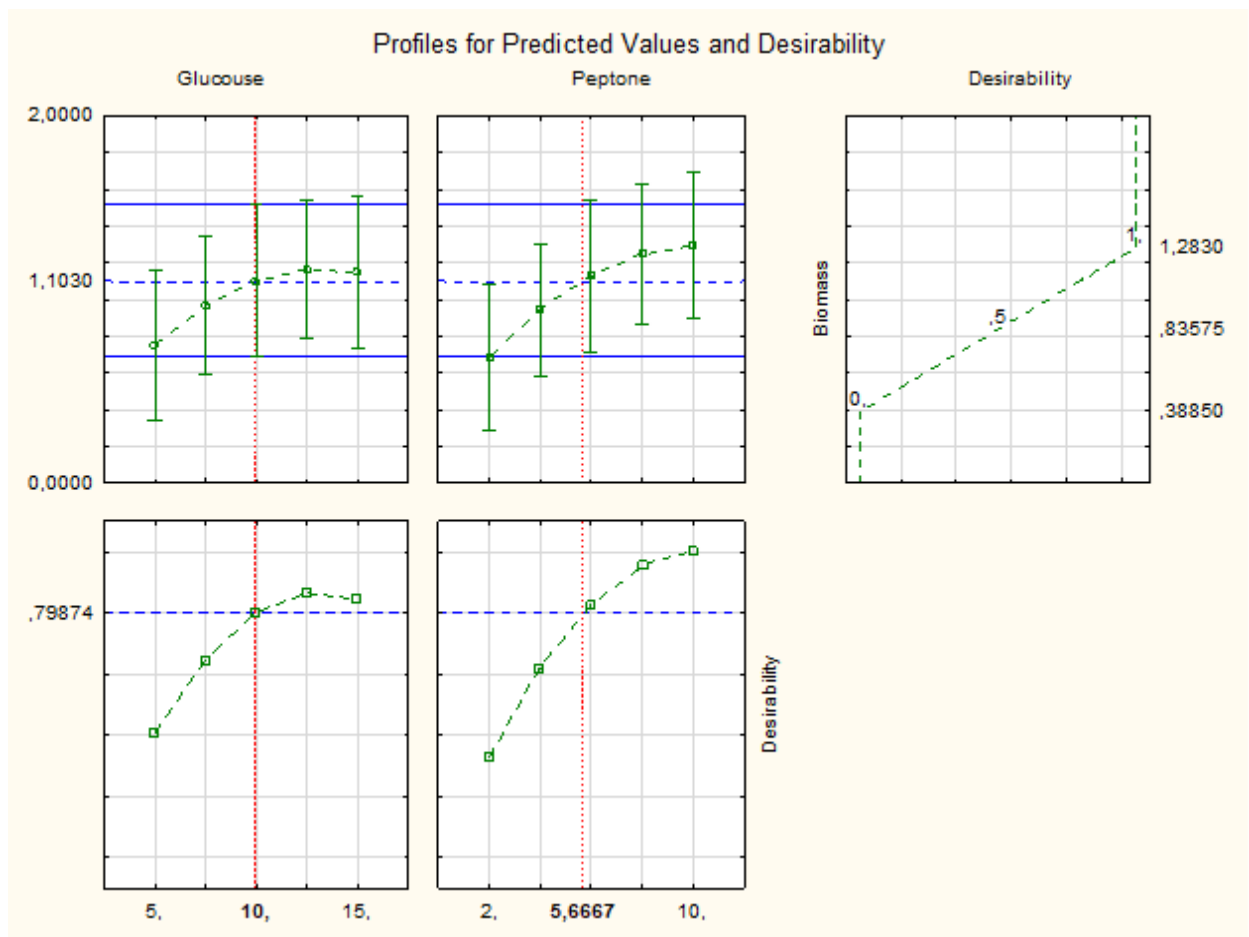


Рис 3.5 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості біомаси (глюкоза та пептон)

3.1.3 Аналіз результатів за загальною кислотністю

Планування лабораторного дослідження з дослідження змін загальної кислотності проби, та варіанти поєднання чинників та одержані результати наведено в табл 3.4.

Таблиця 3.4

Матриця отриманих результатів загальна кислотність за титруванням

варіант	Глюкоза (X_1)	Пептон (X_2)	NaCl	оптична густина, D 540 нм		
				1	2	середнє
варіант 1	5	2	5	1,92	0,60	1,26
варіант 2	5	10	5	3,43	3,31	3,37

варіант 3	5	5	5	3,61	0,30	1,95
варіант 4	10	2	5	1,98	1,86	1,92
варіант 5	10	5	5	4,15	4,09	4,12
варіант 6	10	10	5	4,99	4,51	4,75
варіант 7	15	2	5	1,92	3,31	2,61
варіант 8	15	10	5	4,99	4,51	4,75
варіант 9	15	5	5	3,91	4,69	4,30
MRS				10,82	9,50	10,16

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація пептону, г/л.

Визначення рівня значущості ефектів (лінійного, квадратичного та ефекту взаємодії) показав, що концентрація глюкози(X1) та пептону(X2) та достовірний ($p \leq 0,05$) вплив на вплив на рівень синтезу *Lactobacillus acidophilus* загальних кислот.

Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсійного аналізу рис 3.4.

ANOVA; Var.:Acid; R-sqr=,95263; Adj.:87367 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ([No active dataset]) in Workbook1) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,2233093 DV: Acid					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)PEPTONE (L)	8,31139	1	8,31138E	37,21916	0,008848
PEPTONE (Q)	0,80202	1	0,802017	3,59151	0,154372
(2)GLUCOUSE(L)	4,22783	1	4,227834	18,93264	0,022422
GLUCOUSE(Q)	0,61811	1	0,61810E	2,76793	0,194758
1L by 2L	0,00431	1	0,004314	0,01932	0,898265
Error	0,66993	3	0,22330E		
Total SS	14,14102	8			

Рис. 3.4 Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) залежно від рівня синтезу загальних кислот

Виходячи з рис. 3.4, для візуальної оцінки побудовано діаграму Парето, де ефекти розміщено за спаданням абсолютної величини. З даної діаграми бачимо, що максимальний значущий ефект має лінійна концентрація пептону та глюкози, мінімальний - квадратична концентрація глюкози.

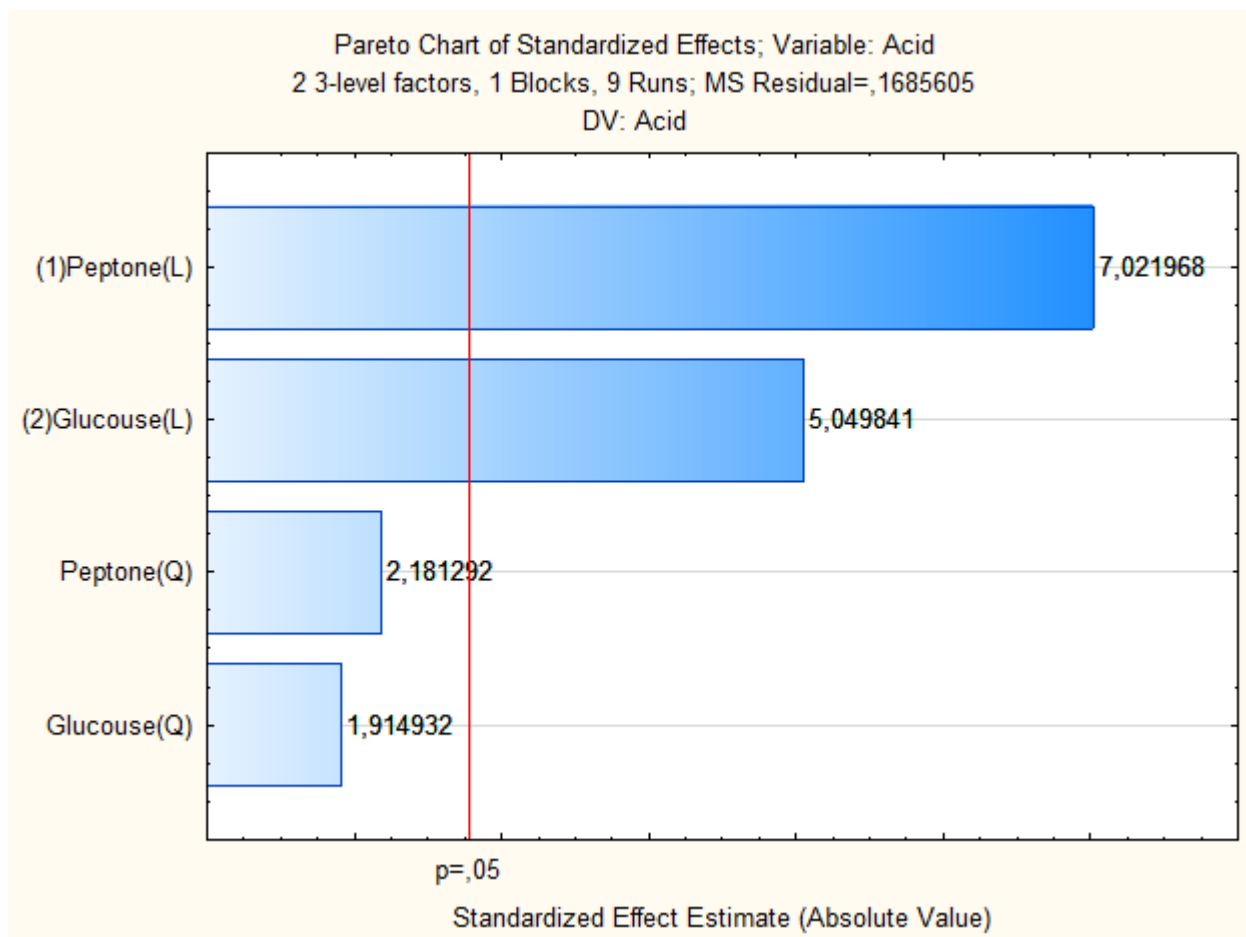


Рис. 3.5 Вплив досліджуваних факторів залежно залежно від рівня синтезу загальних кислот.

Аналізуючи вихідні дані, було отримано рівняння регресії, що враховує лише статистично значущі ефекти: $Y = 3,32 + 1,69 X_1 + 2,35 X_2$ (рис. 3.6)

Effect Estimates; Var.Acid, R-sqr=,95263; Adj.:.87367 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs (No active dataset)) in Workbook1 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,2233093 DV: Acid										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,323447	0,158337	20,98970	0,000237	2,81955	3,827346	3,323447	0,158337	2,819547	3,827346
(1)PEPTONE (L)	2,353917	0,385841	6,10075	0,008848	1,12600	3,581833	1,176958	0,192920	0,563000	1,790917
PEPTONE (Q)	0,639815	0,337610	1,89513	0,154372	-0,43461	1,714242	0,319907	0,168805	-0,217306	0,857121
(2)GLUCOSE(L)	1,687399	0,387804	4,35116	0,022422	0,45323	2,921565	0,843700	0,193902	0,226617	1,460783
GLUCOSE(Q)	0,555925	0,334148	1,66371	0,194758	-0,50748	1,619332	0,277963	0,167074	-0,253741	0,809666
1L by 2L	-0,065006	0,467709	-0,13899	0,898265	-1,55347	1,423454	-0,032503	0,233855	-0,776733	0,711727

Рис. 3.6 Оцінка ефективності залежно від рівня синтезу загальних кислот у вигляді рівняння регресії.

З отриманої моделі виходить, що концентрація пептону та глюкози є важливою для накопичення кислот в пробі та повинні лінійно збільшуватися.

Оптимальні значення для показника загальної кислотності концентрація глюкози становить 10 г/л, пептону 6 г/л(рис. 3.8).

Згідно поверхні відгуку досліджуваних факторів (глюкоза та пептон) (рис. 3.7) негативний вплив має зменшення концентрації як глюкози так і пептону в поживному середовищі.

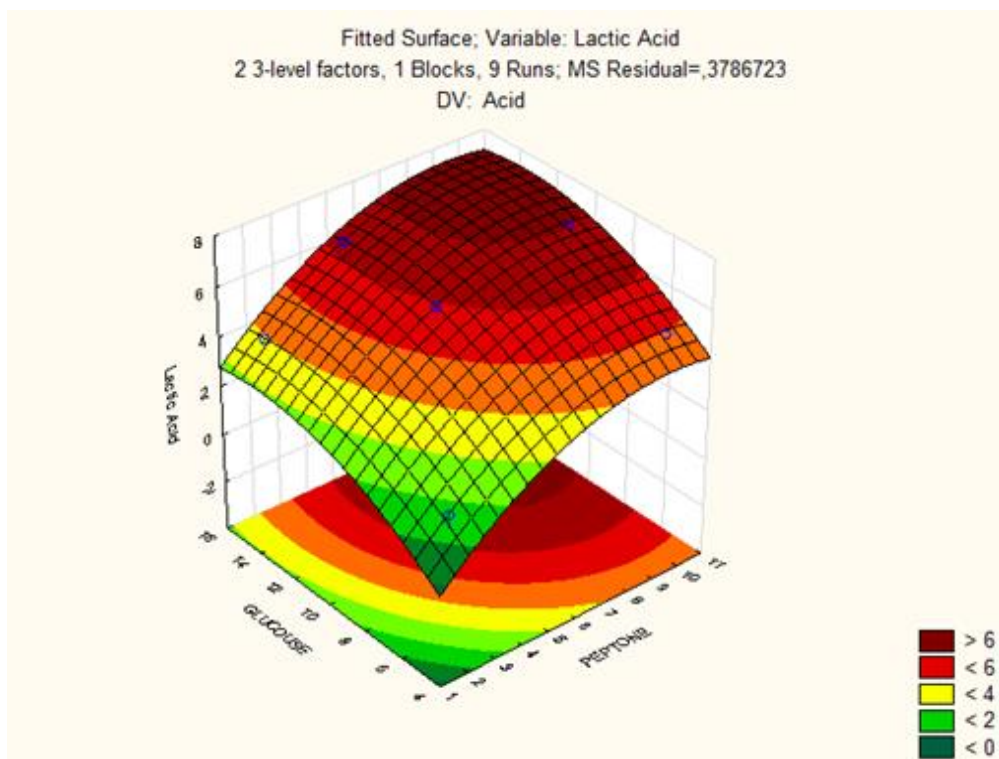


Рис 3.7 Поверхня відгуку показника загальної кислотності від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

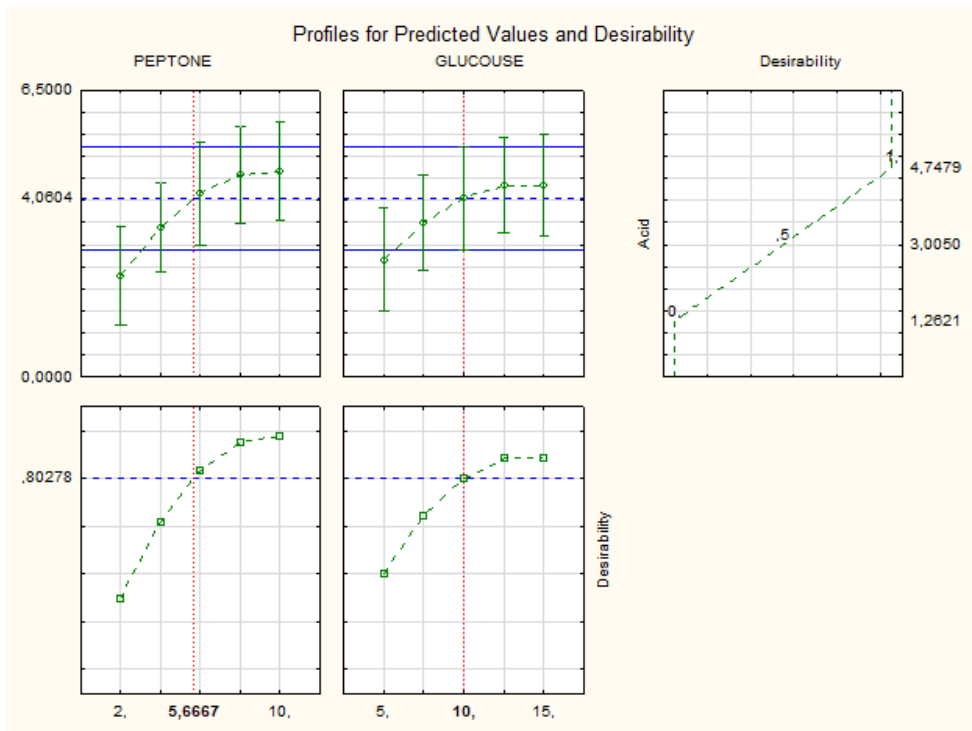


Рис. 3.8 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості загальних кислот (глюкоза та пептон)

3.1.4 Аналіз результатів за молочною кислотою

Планування проведення лабораторного експерименту з вивчення виходу молочної кислоти, варіанти комбінації факторів і отримані результати наведені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Матриця отриманих результатів кількості молочної кислоти за титруванням

варіант	Глюкоза (X_1)	Пептон (X_2)	NaCl	кількість молочної кислоти, мл		
				1	2	середнє
варіант 1	5	2	5	2,88	0,90	1,89
варіант 2	5	10	5	5,13	4,95	5,04
варіант 3	5	5	5	5,40	0,45	2,93
варіант 4	10	2	5	2,97	2,79	2,88

варіант 5	10	5	5	6,22	6,13	6,17
варіант 6	10	10	5	7,48	6,76	7,12
варіант 7	15	2	5	2,88	4,95	3,92
варіант 8	15	10	5	7,48	6,76	7,12
варіант 9	15	5	5	5,86	7,03	6,44
MRS				16,21	14,23	15,22

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація пептону, г/л.

Визначення рівня значущості ефектів (лінійного, квадратичного та ефекту взаємодії) показав, що концентрація глюкози(X1) та пептону(X2) має ($p \leq 0,05$) вплив на вплив на рівень синтезу *Lactobacillus acidophilus* виходу молочної кислоти. Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсійного аналізу (рис3.9).

ANOVA: VarLactic Acid R-sqr=.95263; Adj.:.87367 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ([No active dataset]) in Voloshina2_lactic acid) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=.501667 DV: Lactic Acid					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)PEPTONE (L)	18,67159	1	18,67159	37,21916	0,008848
PEPTONE (Q)	1,80174	1	1,80174	3,59151	0,154372
(2)GLUCOSE(L)	9,49788	1	9,49788	18,93264	0,022422
GLUCOSE(Q)	1,38858	1	1,38858	2,76793	0,194758
1L by 2L	0,00969	1	0,00969	0,01932	0,898265
Error	1,50500	3	0,50167		
Total SS	31,76790	8			

Рис. 3.9 Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) залежно від рівня синтезу молочної кислоти

Для наочної демонстрації виконано побудову діаграми Парето, згідно якої ефекти розміщені в порядку убавання абсолютної величини. З цієї діаграми видно, що максимальний значущий ефект має лінійна концентрація пептону і глюкози, мінімальний - квадратична концентрація глюкози.

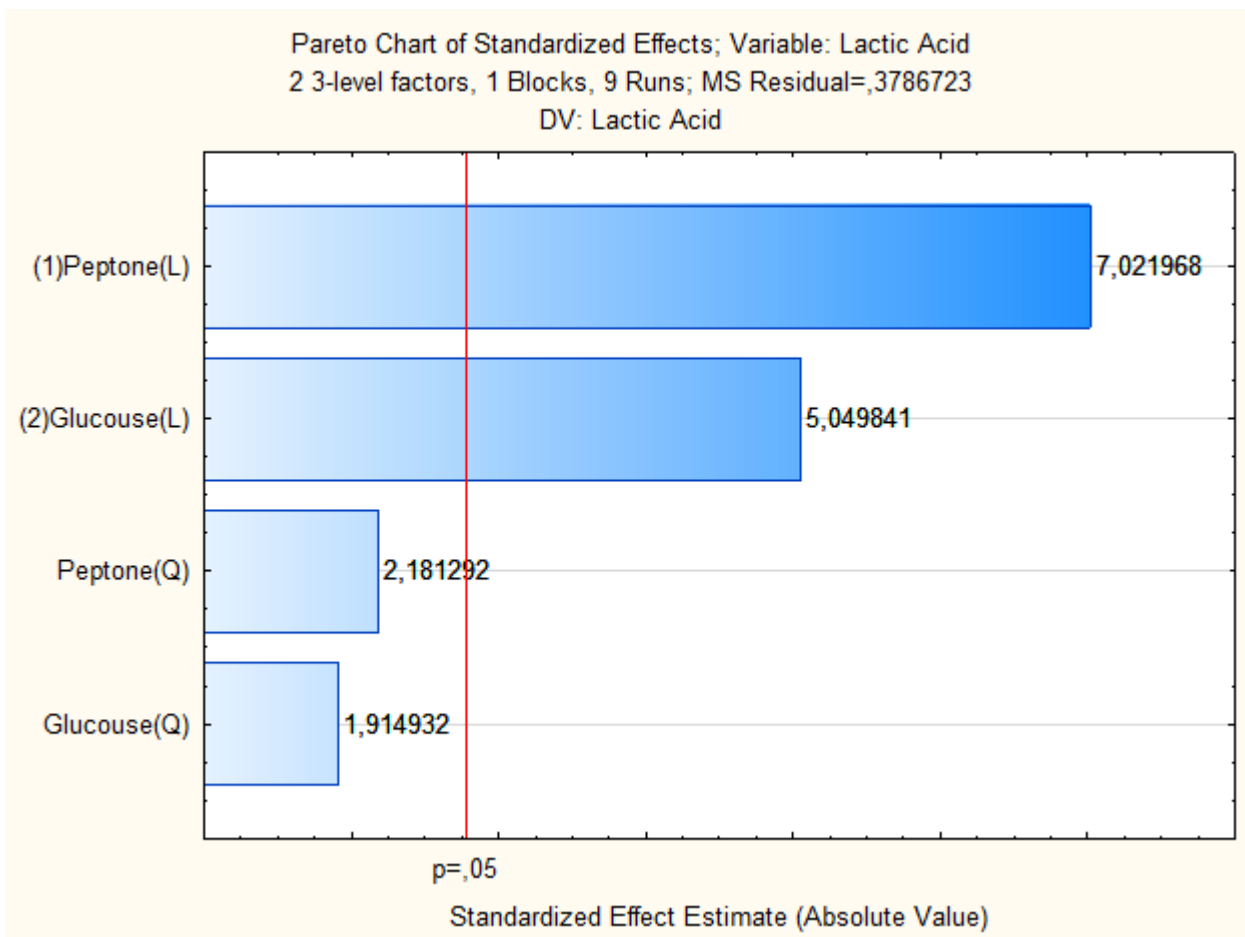


Рис. 3.10 Вплив досліджуваних факторів залежно від рівня накопичення молочної кислоти

При оцінці ефективності накопичення молочної кислоти у вигляді рівняння регресії було отримано результат де, $Y=4.98+3.52X_2+2.53X_1$

Effect Estimates, Var. Lactic Acid R-sqr=.95263; Adj. .87367 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs (No active dataset) in Voloshina2_lectic acid) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,501666 DV: Lactic Acid										
Factor	Effect	Std. Err.	t(3)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	4,981299	0,237321	20,98970	0,000237	4,22604	5,736561	4,981299	0,237321	4,22604	5,736561
(1)PEPTONE (L)	3,528133	0,578311	6,10075	0,008848	1,68769	5,368578	1,764067	0,289156	0,84384	2,684289
PEPTONE (Q)	0,958977	0,506022	1,89513	0,154372	-0,65141	2,569366	0,479488	0,253011	-0,32571	1,284683
(2)GLUCOSE(L)	2,529134	0,581254	4,35116	0,022422	0,67932	4,378945	1,264567	0,290627	0,33966	2,189472
GLUCOSE(Q)	0,833240	0,500832	1,66371	0,194758	-0,76063	2,427112	0,416620	0,250416	-0,38032	1,213556
1L by 2L	-0,097433	0,701019	-0,13899	0,898265	-2,32839	2,133523	-0,048717	0,350510	-1,16419	1,066781

Рис. 3.11 Оцінка ефективності залежно від рівня синтезу молочної кислоти у вигляді рівняння регресії (глюкоза та пептон).

Модель показує, що концентрація пептону та глюкози є важливою для підвищення виходу молочної кислоти і повинна зростати лінійно.

Оптимальними значеннями для зростання рівня синтезу молочної кислоти є концентрація глюкози 10 г/л та пептону 6 г/л (рис. 3.13).

Згідно поверхні відгуку рівня синтезу молочної кислоти від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон) (рис. 3.12) негативний вплив має зменшення концентрації як глюкози так і пептону в поживному середовищі.

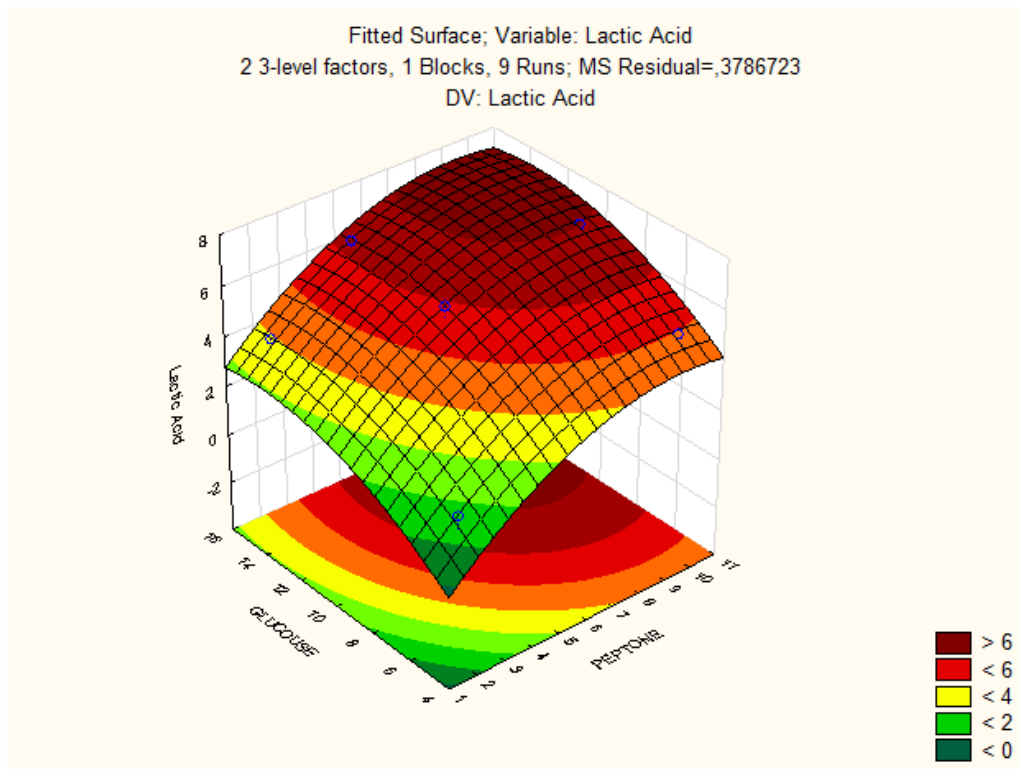


Рис 3.12 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості молочної кислоти.

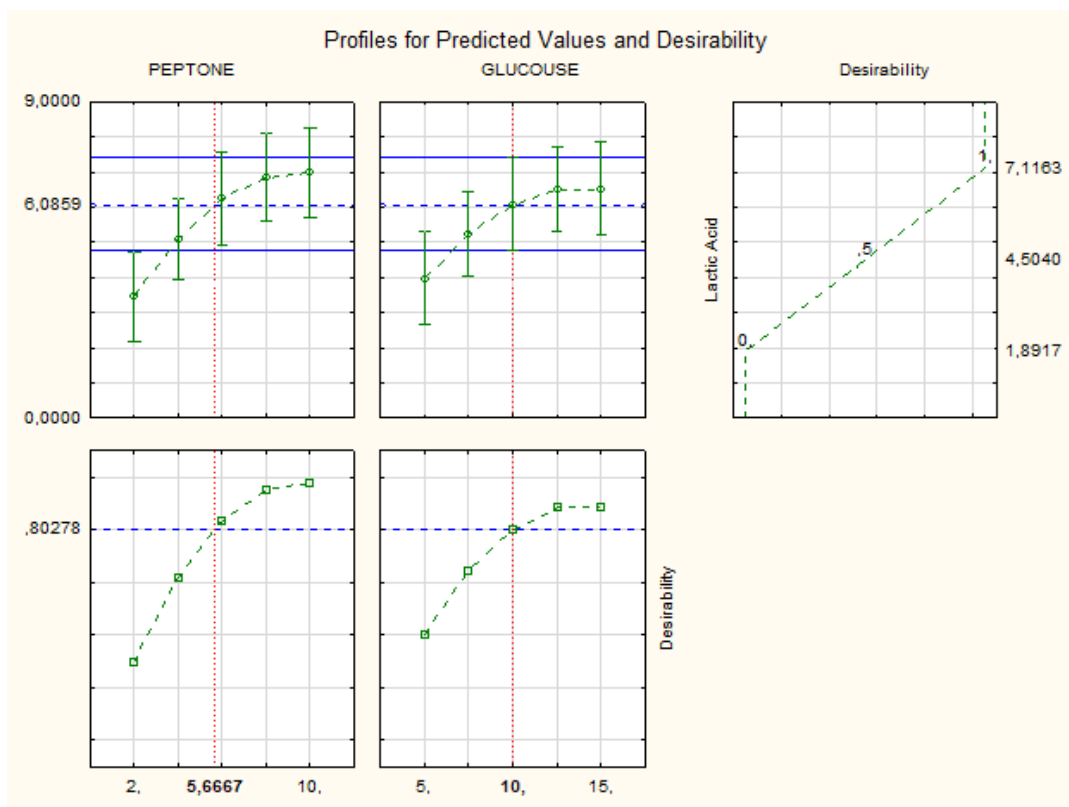


Рис. 3.13 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості загальних кислот.

3.2 Математична модель факторів для оцінки впливу після корекції

План експерименту, та варіанти поєднання факторів приведені в таблиці 3.6 та таблиці 3.7 відповідно.

Таблиця 3.6

Фактори математичної моделі після корекції

Фактори	Рівні факторів		
	L (-1)	0	H (+1)
Концентрація Глюкози (X_1)	8	10	12
Концентрація Пептону (X_2)	4	6	8

Таблиця 3.7

Варіанти поєднання факторів після корекції

№	Рівні факторів оптимізації		параметр оптимізації
	Глюкоза (X_1)	Пептон (X_2)	
1	8	4	Y_1
2	8	6	Y_2
3	8	8	Y_3
4	10	4	Y_4
5	10	6	Y_5
6	10	8	Y_6
7	12	4	Y_7
8	12	6	Y_8
9	12	8	Y_9

Примітка:

X_1 - Концентрація глюкози, г/л.

X_2 - Концентрація пептону, г/л.

3.2.1 Аналіз результатів після корекції за біомасою

Таблиця 3.8

Матриця планування експерименту за планом ПФЕ після корекції

варіант	Глюкоза	Пептон	NaCl	кількість біомаси
---------	---------	--------	------	-------------------

	(X ₁)	(X ₂)		1	2	середнє
варіант 1	8	4	5	0,693	0,773	0,733
варіант 2	8	6	5	0,769	0,81	0,7895
варіант 3	8	8	5	0,809	0,834	0,8215
варіант 4	10	4	5	0,749	0,842	0,7955
варіант 5	10	6	5	0,813	0,762	0,7875
варіант 6	10	8	5	0,805	0,815	0,81
варіант 7	12	4	5	0,777	0,767	0,772
варіант 8	12	6	5	0,771	0,804	0,7875
варіант 9	12	8	5	0,735	0,753	0,744
MRS				0,847	0,845	0,846

Примітка:

X₁ - Концентрація глюкози, г/л.

X₂ - Концентрація пептону, г/л.

Визначення рівня значущості ефектів (лінійного, квадратичного та ефекту взаємодії) показав, що концентрація пептону(X₂) та глюкози(X₁) не має впливу на приріст біомаси. Показником

Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсійного аналізу (рис. 3.14).

ANOVA; Var.Biomass ; R-sqr=.88435; Adj;.69159 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ([No active dataset]) in Voloshina3) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=.000254 DV: Biomass					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Glucose L+Q	0,001339	2	0,000670	2,63634	0,218379
(2)Peptone L+Q	0,001094	2	0,000547	2,15300	0,263125
1*2	0,003393	1	0,003393	13,36058	0,035363
Error	0,000762	3	0,000254		
Total SS	0,006588	8			

Рис. 3.14 Таблиця дисперсійного аналізу після корекції по накопиченню біомаси

Виконано побудову діаграми Парето, згідно якої ефекти розміщені в порядку убутання абсолютної величини. З цієї діаграми видно, що максимальний значущий ефект має лінійна залежність поєднаної дії, мінімальний - квадратична концентрація пептону.

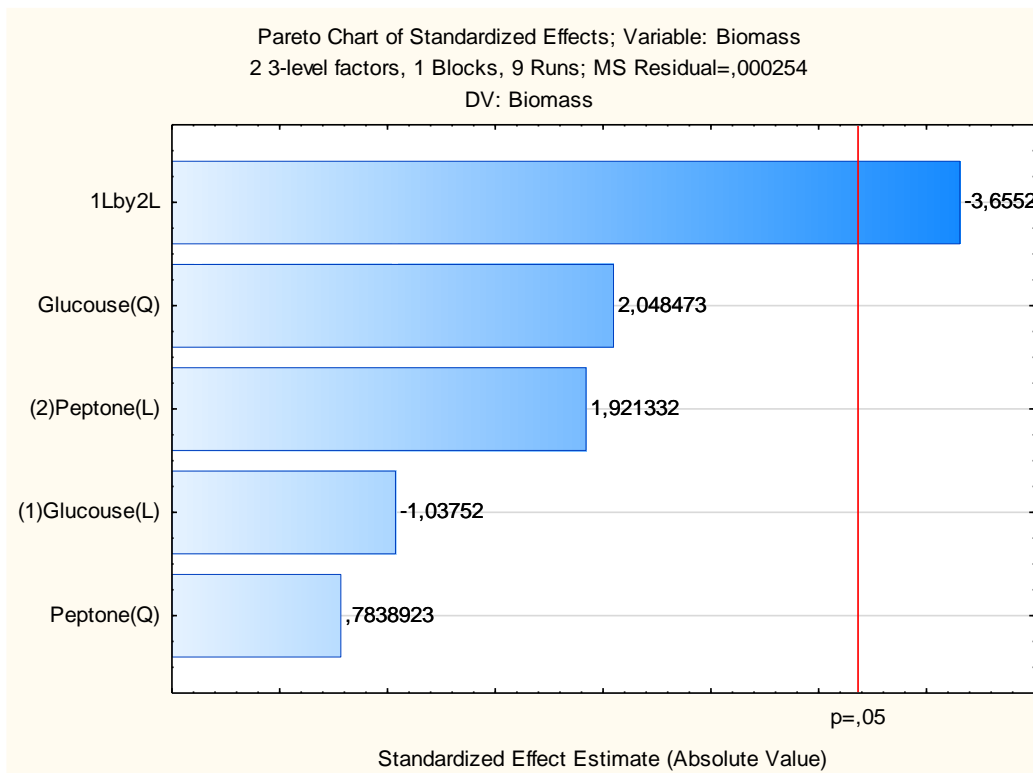


Рис. 3.15 Вплив досліджуваних факторів після корекції залежно від рівня накопичення біомаси

В ході аналізу вихідних даних було отримано рівняння регресії, яке має вигляд полінома, що враховує лише статистично значущі ефекти:

$$Y = 0,782 - 0,058X1X2$$

Effect Estimates; VaBiomass; R-sq=,88435; Adj:,69159 (3*(2-0) full factorial design, 1 block, 9 runs (No active dataset)) in Voloshina3 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,000254 DV: Biomass										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,782278	0,005312	147,2648	0,000001	0,765372	0,799183	0,782278	0,005312	0,765372	0,799183
(1)Glucose(L)	-0,013500	0,013012	-1,0375	0,375777	-0,054909	0,027909	-0,006750	0,006506	-0,027455	0,013955
Glucose(Q)	0,023083	0,011269	2,0485	0,132959	-0,012778	0,058945	0,011542	0,005634	-0,006389	0,029472
(2)Peptone (L)	0,025000	0,013012	1,9213	0,150441	-0,016409	0,066409	0,012500	0,006506	-0,008205	0,033205
Peptone (Q)	0,008833	0,011269	0,7839	0,490299	-0,027028	0,044695	0,004417	0,005634	-0,013514	0,022347
1L by 2L	-0,058250	0,015936	-3,6552	0,035363	-0,108966	-0,007534	-0,029125	0,007968	-0,054483	-0,003767

Рис 3.16 Оцінка ефективності після корекції залежно від рівня накопичення біомаси у вигляді рівняння регресії.

З отриманої моделі виходить, що концентрація пептону виявилась найбільш важливим фактором, зі збільшенням якого приріст біомаси *Lactobacillus acidophilus* повинна лінійно збільшуватися.

Оптимальні значення для приросту біомаси концентрація глюкози становить 10 г/л, пептону 5,667 г/л(рис. 3.19).

Згідно поверхні відгуку приросту біомаси *Lactobacillus acidophilus* від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон) (рис. 3.17, рис. 3.18) негативний вплив має зменшення концентрації пептону та глюкози в поживному середовищі. Але збільшення концентрації глюкози в поживному середовищі вище 12 г/мл також має негативний вплив на приріст біомаси в отриманих зразках.

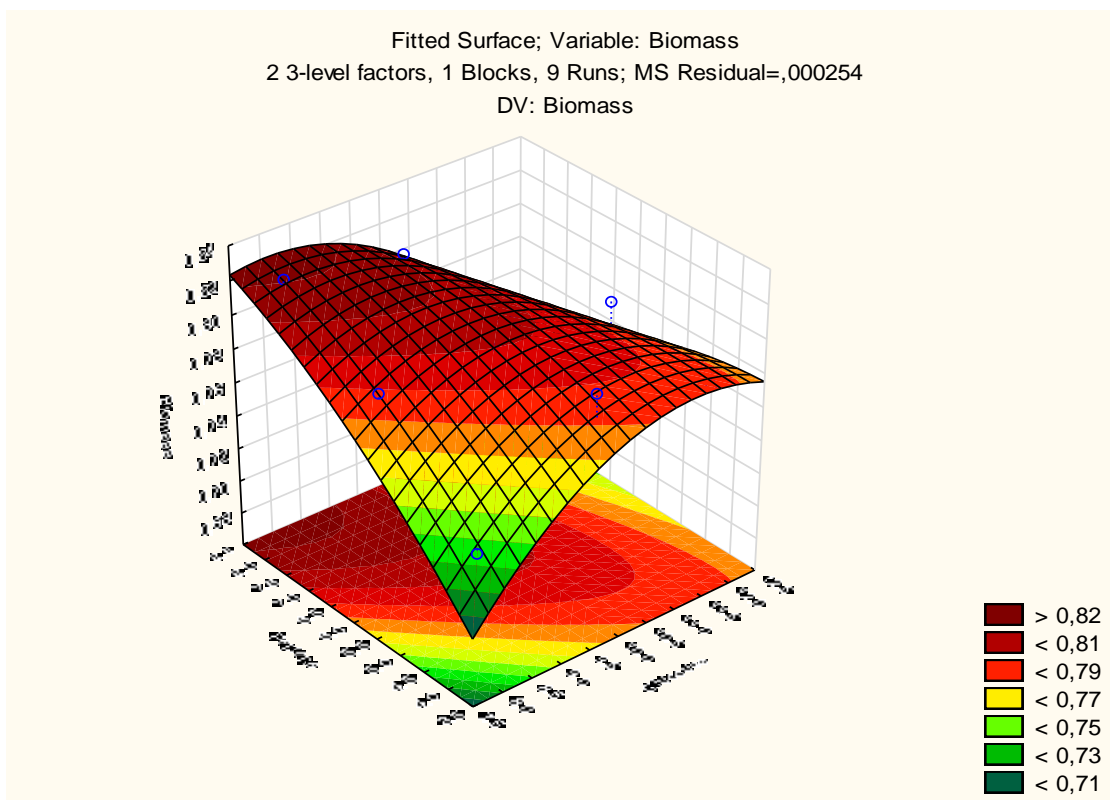


Рис 3.17 Поверхня відгуку після корекції накопичення біомаси від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

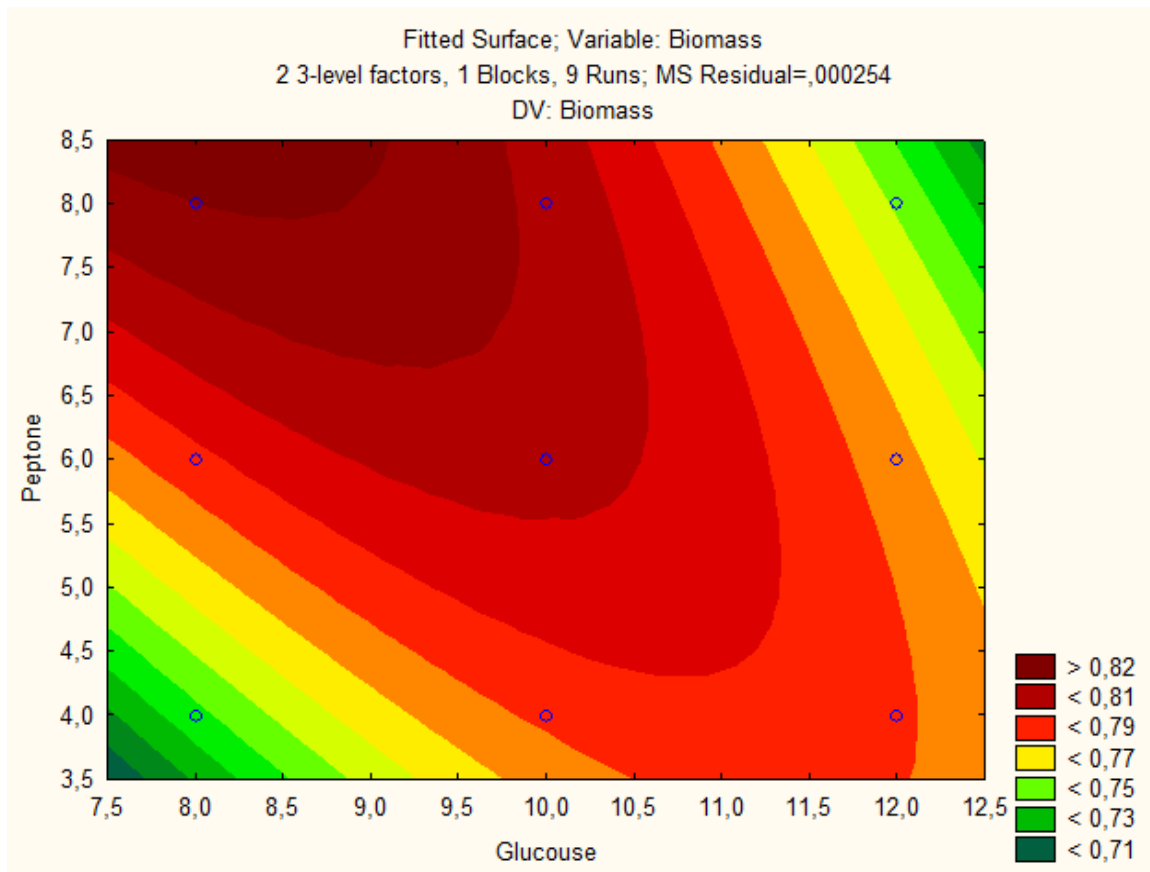


Рис 3.18 Двох вимірний вигляд поверхні відгуку після корекції накопичення біомаси від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

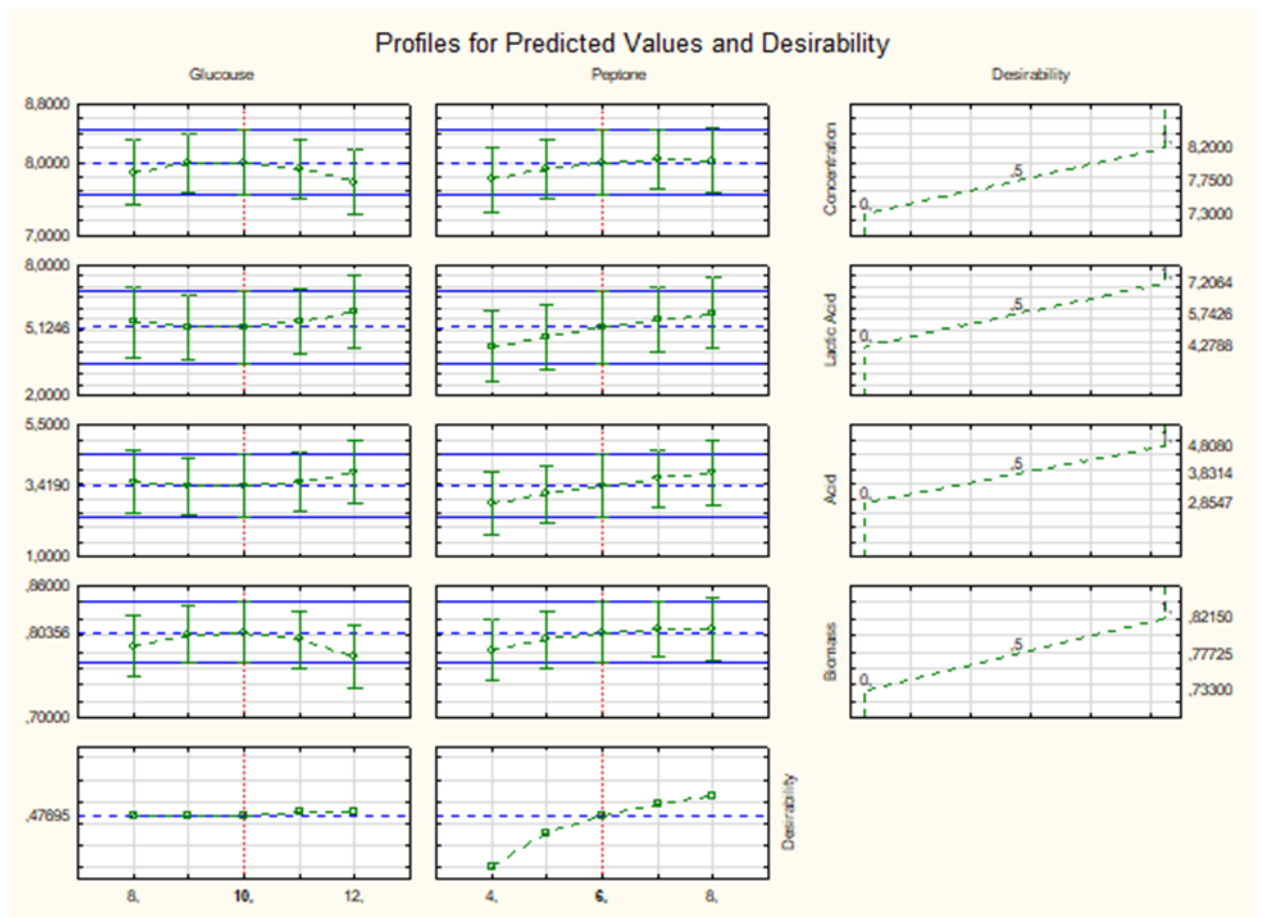


Рис. 3.19 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості біомаси.

3.2.2 Аналіз результатів після корекції за загальною кислотністю проби
Планування лабораторного дослідження після корекції з дослідження змін загальної кислотності проби, та варіанти поєднання чинників та одержані результати наведено в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

Матриця отриманих результатів загальна кислотність за титруванням

варіант	Глюкоза (X_1)	Пептон (X_2)	NaCl	оптична густина, D 540 нм		
				1	2	середнє
варіант 1	8	4	5	3,25	3,01	3,13
варіант 2	8	6	5	3,43	3,37	3,40

варіант 3	8	8	5	3,55	4,63	4,09
варіант 4	10	4	5	3,07	3,31	3,19
варіант 5	10	6	5	3,13	4,03	3,58
варіант 6	10	8	5	3,73	3,01	3,37
варіант 7	12	4	5	2,70	3,01	2,85
варіант 8	12	6	5	2,94	4,93	3,94
варіант 9	12	8	5	6,61	3,01	4,81
MRS				12,92	14,24	13,58

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація пептону, г/л.

Визначення рівня значущості ефектів (лінійного, квадратичного та ефекту взаємодії) показав, що жоден з факторів не має достовірного ($p \leq 0,05$) впливу на рівень синтезу *Lactobacillus acidophilus* загальних кислот.

Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсійного аналізу (рис. 5.1).

ANOVA; Var.Acid; R-sqr=,77885; Adj.:41028 (3**(2-0) full factorial design, 1 block, 9 runs ((No active dataset)) in Voloshina3) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,2107591 DV: Acid					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Glucose L+Q	0,375850	2	0,187925	0,891657	0,496694
(2)Peptone L+Q	1,605137	2	0,802569	3,807990	0,150225
1*2	0,245842	1	0,245842	1,166462	0,359216
Error	0,632277	3	0,210759		
Total SS	2,859107	8			

Рис. 3.20 Результати після корекції дисперсійного аналізу (ANOVA) залежно від рівня синтезу загальних кислот

Виходячи з рис. 3.20, для візуальної оцінки побудовано діаграму Парето, де ефекти розміщено за спаданням абсолютної величини. З даної діаграми бачимо, що жоден з факторів вважаються статистично не значущими ($p \leq 0,05$) на рівень

синтезу *Lactobacillus acidophilus* загальних кислот.

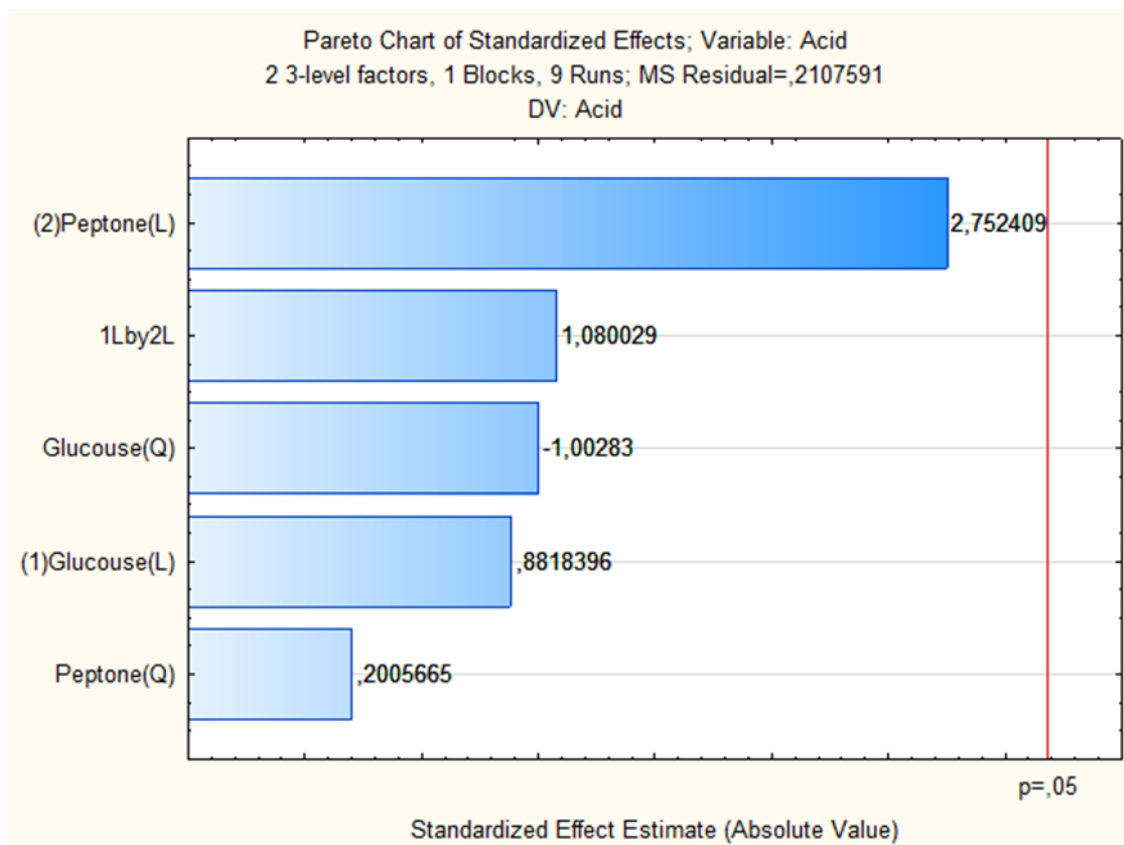


Рис. 3.21 Вплив досліджуваних факторів після корекції залежно від рівня синтезу загальних кислот.

Аналізуючи вихідні дані, було отримано $Y = 3,59$ (рис. 3.22)

Effect Estimates; VarAcid R-sqr=,77885; Adj.:41028 (3**(2-0) full factorial design, 1 block, 9 runs (No active dataset)) in Voloshina3) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,2107591 DV: Acid										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coef.	Std.Err. Coef.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,592644	0,153028	23,47698	0,000169	3,10564	4,079649	3,592644	0,153028	3,105640	4,079649
(1)Glucose(L)	0,330550	0,374841	0,88184	0,442799	-0,86236	1,523463	0,165275	0,187421	-0,431181	0,761731
Glucose(Q)	-0,325542	0,324622	-1,00283	0,389833	-1,35863	0,707551	-0,162771	0,162311	-0,679317	0,353775
(2)Peptone (L)	1,031717	0,374841	2,75241	0,070600	-0,16120	2,224629	0,515858	0,187421	-0,080598	1,112315
Peptone (Q)	0,065108	0,324622	0,20057	0,853865	-0,96798	1,098201	0,032554	0,162311	-0,483992	0,549100
1L by 2L	0,495825	0,459085	1,08003	0,359216	-0,96519	1,956839	0,247913	0,229543	-0,482594	0,978419

Рис 3.22 Оцінка ефективності після корекції залежно від рівня синтезу загальних кислот у вигляді рівняння регресії

З отриманої моделі виходить, що концентрація пептону та глюкози є важливою для підвищення накопичення загальної кислотності проби, зі збільшенням яких загальної кислотності отриманих зразків повинна лінійно збільшуватися.

Оптимальні значення концентрація глюкози становить 10 г/л, пептону 5,667 г/л(рис. 3.24).

Згідно поверхні відгуку накопичення загальної кислотності в пробі *Lactobacillus acidophilus* від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон) (рис. 3.22, рис. 3.23) негативний вплив має зменшення концентрації пептону та глюкози в поживному середовищі.

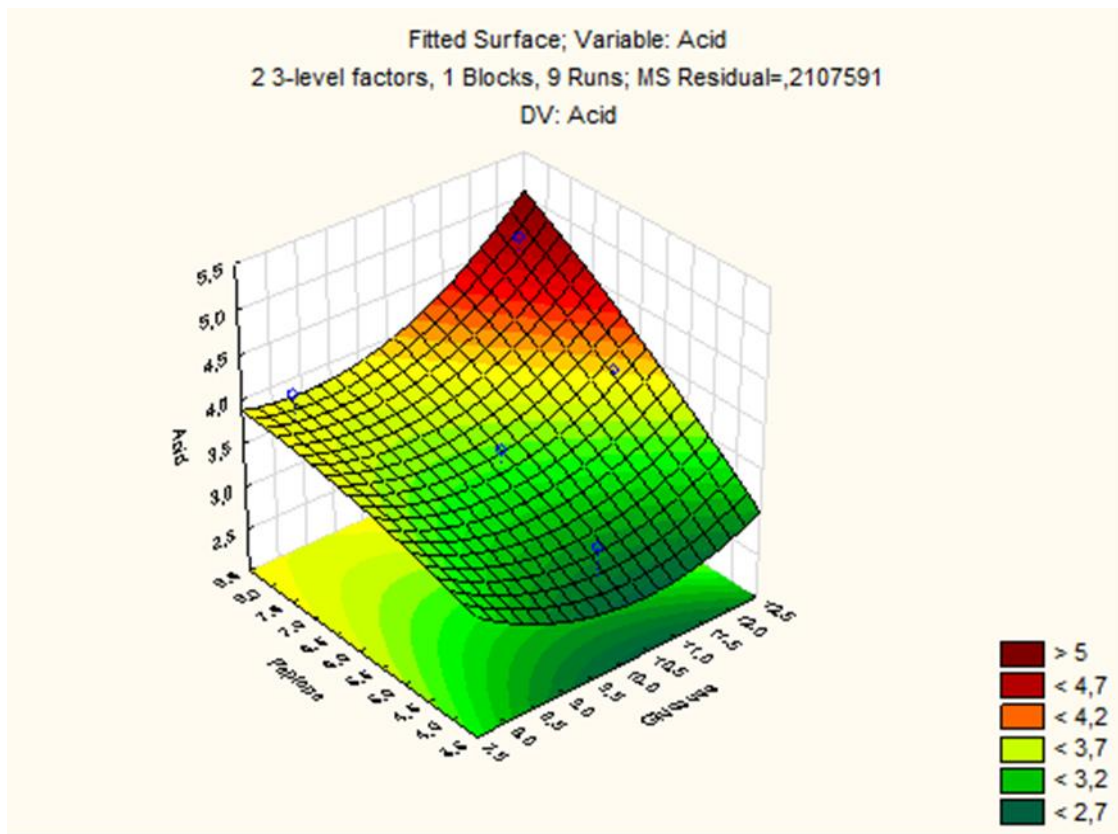


Рис. 3.22 Поверхня відгуку після корекції загальна кислотність проб від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

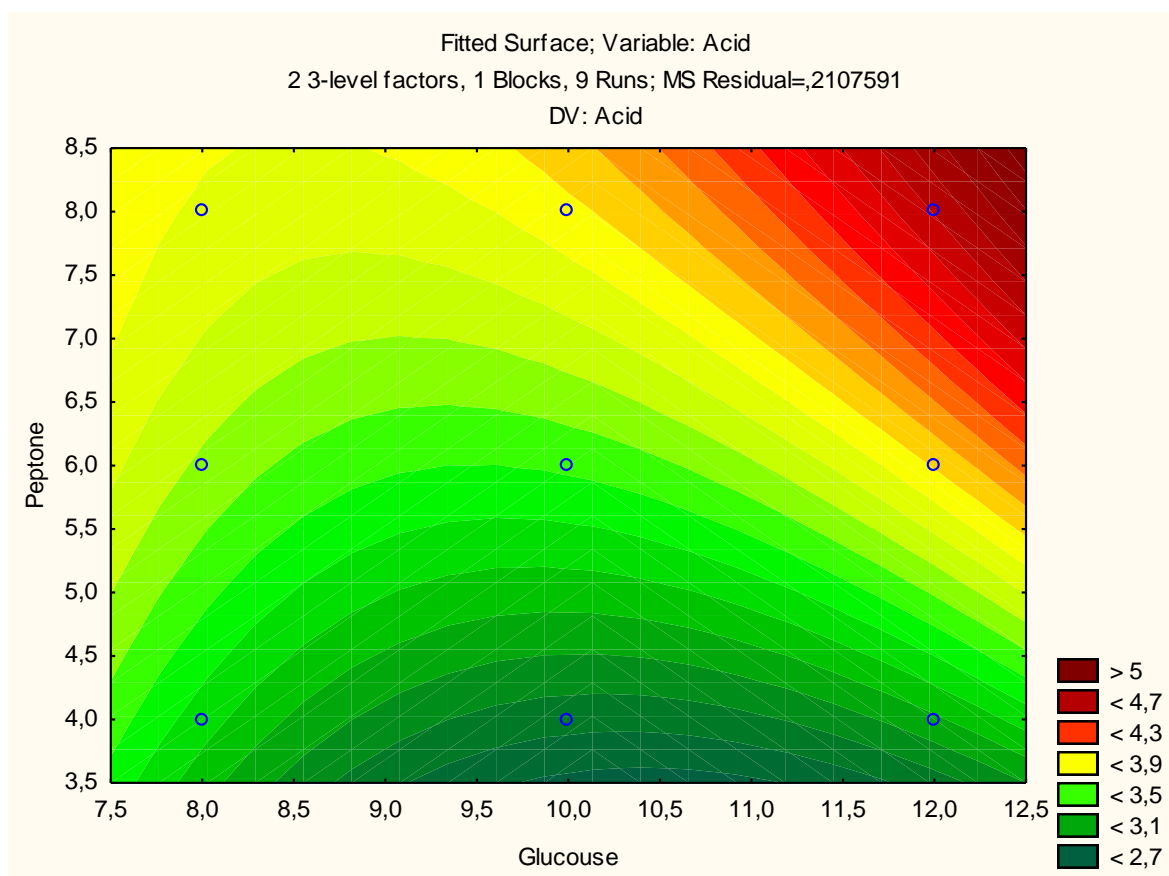


Рис. 3.23 Двох вимірний вигляд поверхні відгуку після корекції загальна кислотність проб від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

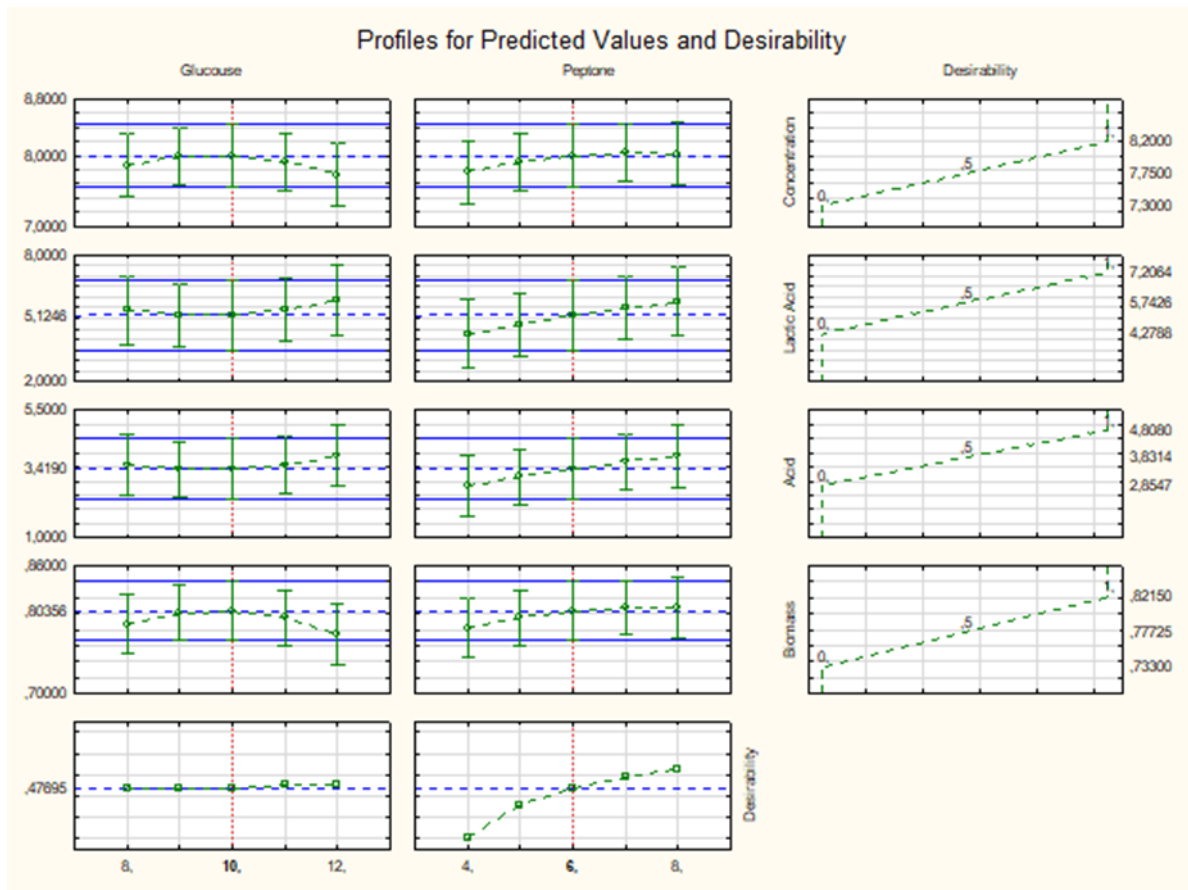


Рис. 3.24 Профілі прогнозованих значень після корекції факторів для отримання максимальної кількості накопичення загальної кислотності проби.

3.2.3 Аналіз результатів після корекції за молочною кислотою

Планування проведення лабораторного експерименту після корекції з вивчення виходу молочної кислоти, варіанти комбінації факторів і отримані результати наведені в таблиці 3.10.

Таблиця 3.10

Матриця отриманих результатів кількість молочної кислоти за титруванням

варіант	Глюкоза (X_1)	Пептон (X_2)	NaCl	кількість молочної кислоти, мл		
				1	2	середнє
варіант 1	8	4	5	4,86	4,50	4,68
варіант 2	8	6	5	5,13	5,04	5,09

варіант 3	8	8	5	5,31	6,94	6,13
варіант 4	10	4	5	4,59	4,95	4,77
варіант 5	10	6	5	4,68	6,04	5,36
варіант 6	10	8	5	5,58	4,50	5,04
варіант 7	12	4	5	4,05	4,50	4,28
варіант 8	12	6	5	4,41	7,39	5,90
варіант 9	12	8	5	9,91	4,50	7,21
MRS				19,37	21,35	20,36

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація пептону, г/л.

Визначення рівня значущості ефектів (лінійного, квадратичного та ефекту взаємодії) показав, що концентрація пептону(X2) та глюкози(X1) не має ($p \leq 0,05$) вплив на вплив на рівень синтезу *Lactobacillus acidophilus* молочної кислоти. Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсійного аналізу(рис 3.25).

ANOVA; Var:Lactic Acid R-sq=,77885; Adj.:41028 (3**(2-0) full factorial design, 1 block, 9 runs ((No active dataset)) in Voloshina3) 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,4734719 DV: Lactic Acid					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Glucose L+Q	0,844349	2	0,422175	0,891657	0,496694
(2)Peptone L+Q	3,605952	2	1,802976	3,807990	0,150225
1*2	0,552287	1	0,552287	1,166462	0,359216
Error	1,420416	3	0,473472		
Total SS	6,423003	8			

Рис. 3.25 Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) залежно від рівня синтезу молочної кислоти

За діаграмою Парето, згідно якої ефекти розміщені в порядку убавання абсолютної величини. Видно, що . З даної діаграми бачимо, що жоден з

факторів вважаються статистично не значущими ($p \leq 0,05$) на рівень синтезу *Lactobacillus acidophilus* молочної кислоти.

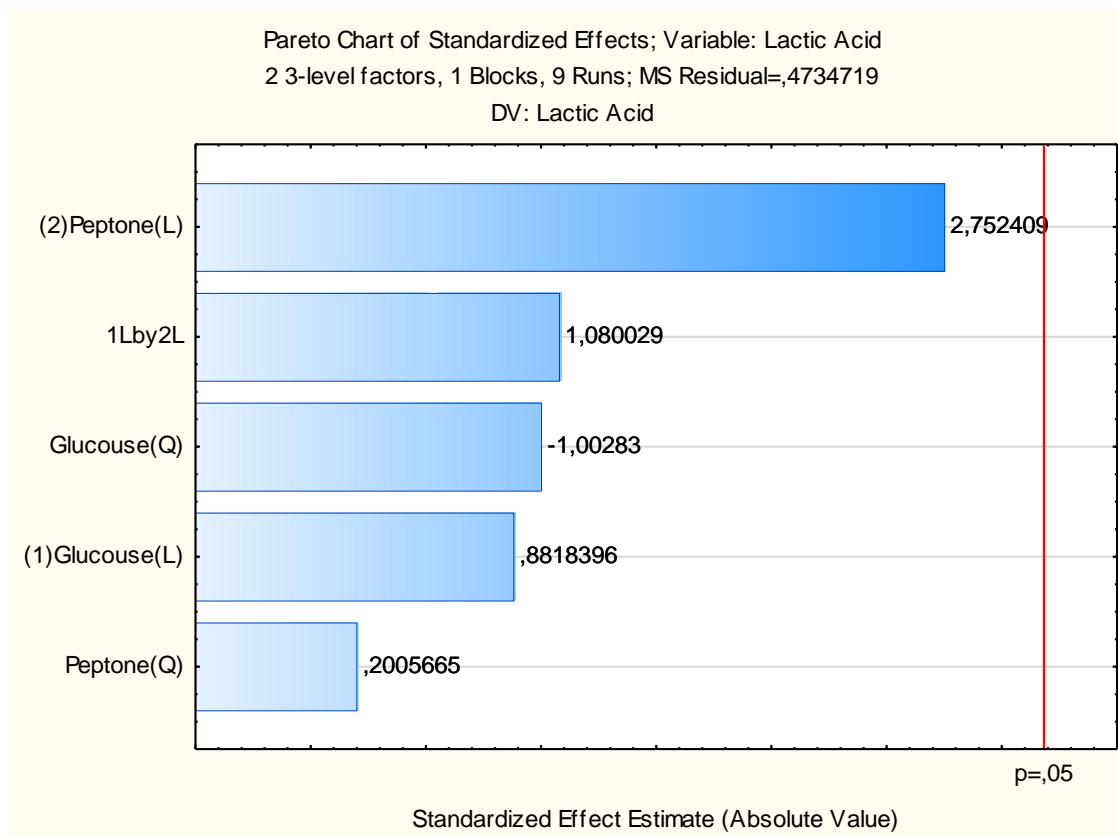


Рис. 3.26 Вплив досліджуваних факторів після корекції залежно від рівня синтезу молочної кислоти.

При оцінці ефективності накопичення молочної кислоти було отримано результат де, $Y=5,38$.

Effect Estimates; VaLactic AcidR-sqr=,77885; Adj:,41028 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs (No active dataset)) in Voloshina3 2 3-level factors, 1 Blocks, 9 Runs; MS Residual=,4734719 DV:Lactic Acid										
Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	5,384782	0,229364	23,47698	0,000169	-4,65484	6,114722	5,384782	0,229364	-4,65484	6,114722
(1)Glucose(L)	0,495440	0,561826	0,88184	0,442799	-1,29254	2,283420	0,247720	0,280913	-0,64627	1,141710
Glucose(Q)	-0,487933	0,486555	-1,00283	0,389833	-2,03637	1,060502	-0,243967	0,243278	-1,01818	0,530251
(2)Peptone (L)	1,546373	0,561826	2,75241	0,070600	-0,24161	3,334353	0,773187	0,280913	-0,12080	1,667176
Peptone (Q)	0,097587	0,486555	0,20057	0,853865	-1,45085	1,646022	0,048793	0,243278	-0,72542	0,823011
1L by 2L	0,743160	0,688093	1,08003	0,359216	-1,44666	2,932979	0,371580	0,344046	-0,72333	1,466489

Рис. 3.27 Оцінка ефективності після корекції залежно від рівня синтезу молочної кислоти у вигляді рівняння регресії.

З отриманої моделі виходить, що концентрація пептону та глюкози є важливою для підвищення накопичення молочної кислоти в отриманих зразках, зі збільшенням яких показник акумуляції повинен лінійно збільшуватися.

Оптимальні значення концентрація глюкози становить 10 г/л, пептону 5,667 г/л(рис. 3.30).

Згідно поверхні накопичення молочної кислоти від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон) (рис. 3.28, рис. 3.29) негативний вплив має зменшення концентрації пептону та глюкози в поживному середовищі.

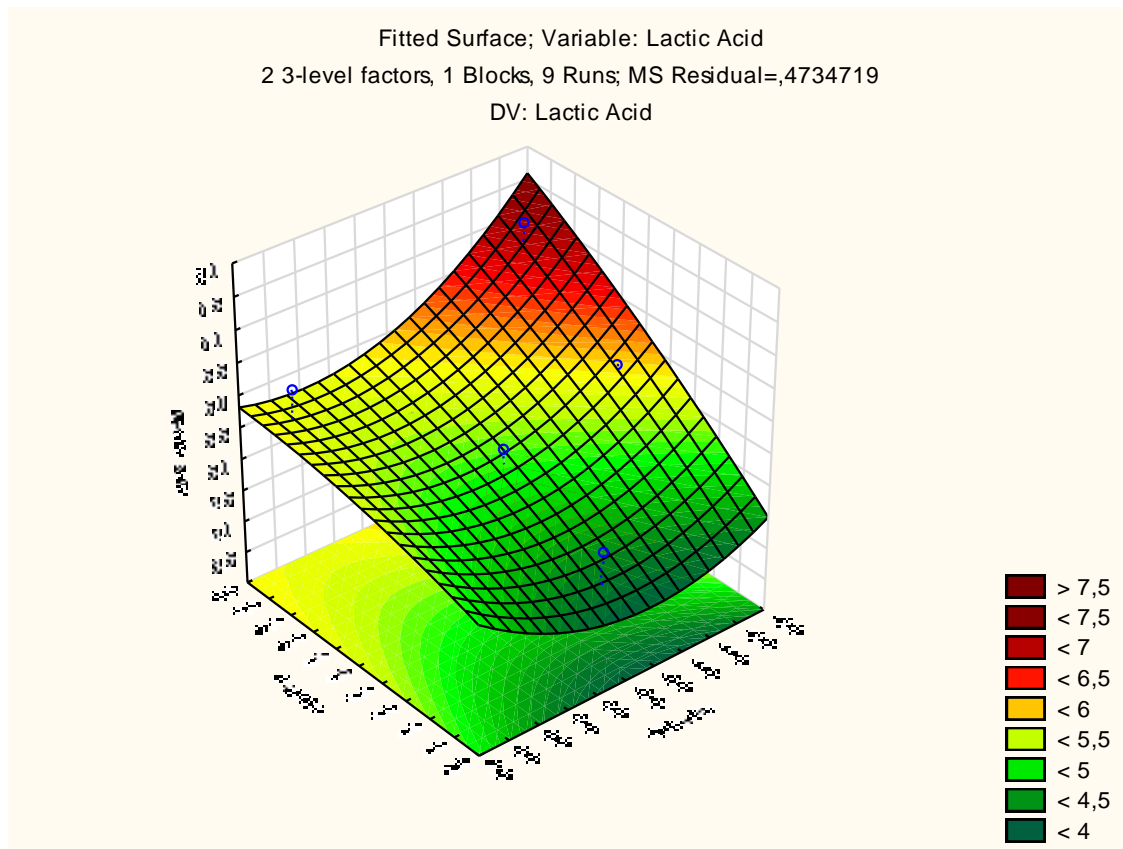


Рис. 3.28 Поверхня відгуку після корекції накопичення молочної кислоти від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

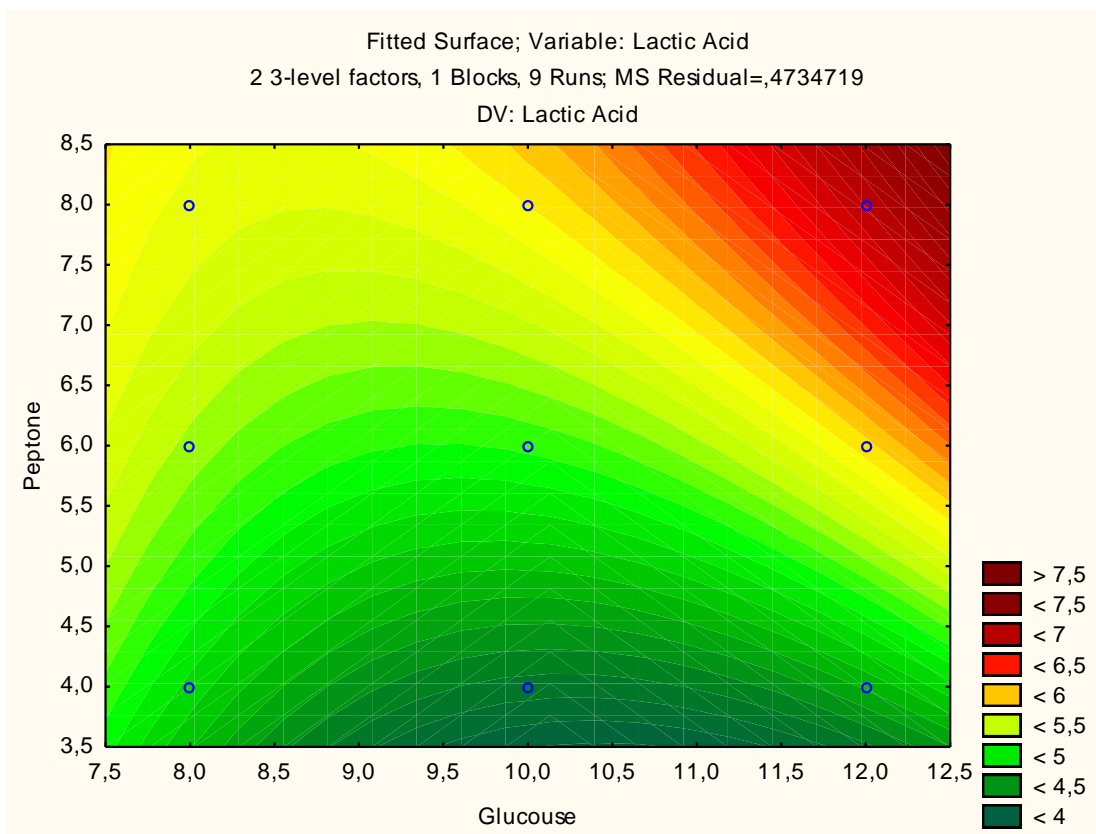


Рис. 3.29 Двох вимірний вигляд поверхні відгуку після корекції загальна кислотність проб від досліджуваних факторів (глюкоза та пептон)

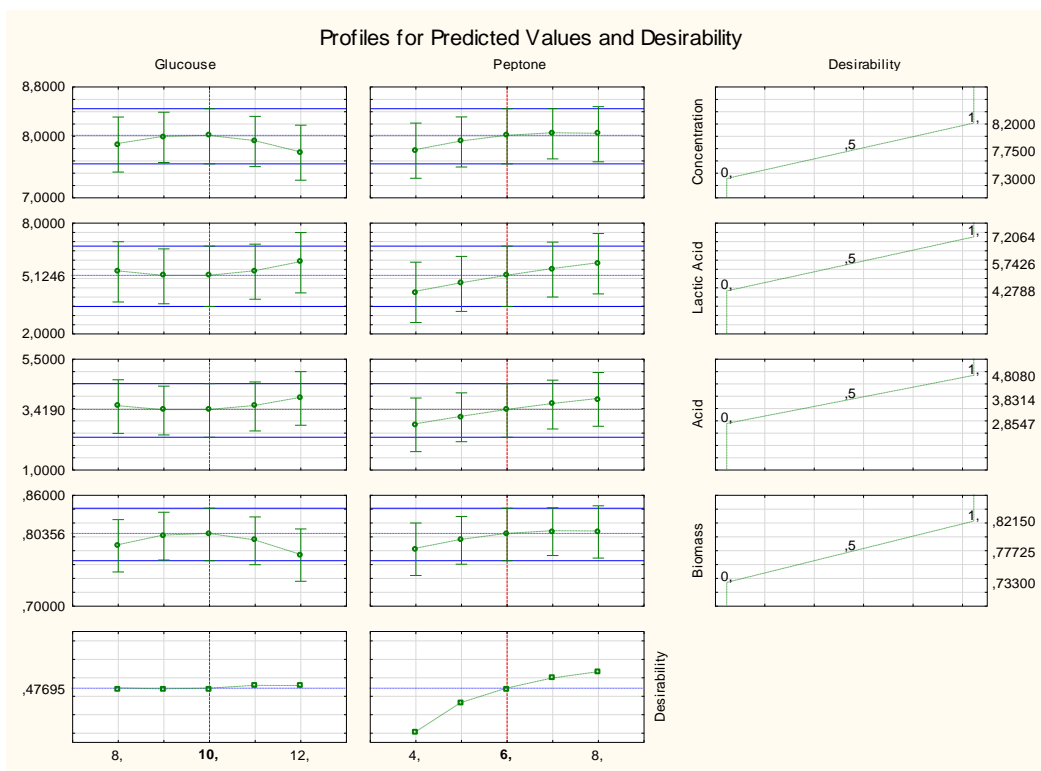


Рис. 3.30 Профілі прогнозованих значень після корекції факторів для отримання максимальної кількості накопичення молочної кислоти в пробі.

3.3 Математична модель факторів для оцінки впливу з додаванням сахарози

План експерименту, а також варіанти поєднання факторів приведені в таблиці 3.11 та таблиці 3.12 відповідно.

Таблиця 3.11

Фактори математичної моделі

Фактори	Рівні факторів		
	L (-1)	0	H (+1)
Концентрація глюкоза (X_1)	3	5	7
Концентрація (X_2)	3	5	7

Таблиця 3.12

Матриця планування експерименту за планом ПФЕ

№	Рівні факторів оптимізації		параметр оптимізації
	Глюкоза (X_1)	Сахароза (X_2)	
1	3	3	Y_1
2	3	5	Y_2
3	3	7	Y_3
4	5	3	Y_4
5	5	5	Y_5

6	5	7	Y_6
7	7	3	Y_7
8	7	5	Y_8
9	7	7	Y_9

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація пептону, г/л.

3.3.1 Аналіз результатів за біомасою з додаванням сахарози

План експерименту з вивчення змін накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus*, а також варіанти поєднання чинників та отримані результати наведені в таблиці 3.13.

Таблиця 3.12

Матриця отриманих результатів кількості біомаси за оптичною густиною

Варіант	Глюкоза X_1	Сахароза X_2	Пептон	NaCl	кількість біомаси		
					1	2	середнє
варіант 1	3	3	6	5	0,32	0,345	0,3325
варіант 2	3	5	6	5	1,43	1,395	1,4125
варіант 3	3	7	6	5	1,47	1,424	1,447
варіант 4	5	3	6	5	1,048	1,193	1,1205
варіант 5	5	5	6	5	1,66	1,732	1,696
варіант 6	5	7	6	5	1,75	1,722	1,736
варіант 7	7	3	6	5	1,45	1,45	1,45
варіант 8	7	5	6	5	1,635	1,693	1,664
варіант 9	7	7	6	5	1,497	1,673	1,585

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X₂ - Концентрація сахарози, г/л.

Рівень значущості ефектів (лінійних, квадратичних і ефектів взаємодії) визначали методом дисперсійного аналізу (ANOVA), який показав, що концентрація як глюкози (X₁) так і сахарози (X₂) та залежність цих факторів має достовірний ($p \leq 0,05$) вплив на вплив на приріс біомаси *Lactobacillus acidophilus*.

Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсного аналізу (рис. 3.31)

Дисперсионный анализ; Прим.: Biomass ; R-кв.=96772; Скор.,91392 (3**(2-0) полный факторный план, 1 блок (Таблица данных1) в Рабочая книга1 2 3-х уровневые ф. 1 Блоки; Остаточн.SS=,0164014 ЗП Biomass					
Фактор	SS	cc	MS	F	p
(1)Glucose L+Q	0,460386	2	0,230193	14,03495	0,030004
(2)Saccharouse L+Q	0,774808	2	0,387404	23,62018	0,014592
1*2	0,239855	1	0,239855	14,62406	0,031485
Ошибка	0,049204	3	0,016401		
Общая SS	1,524253	8			

Рис. 3.31 Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) (глюкоза, сахароза)

Примітка:

L - Лінійні ефекти фактора;

Q - Нелінійні (квадратичні) ефекти фактора;

«*» -позначення поєднаної дії декількох факторів.

Для візуалізації оцінки на рис. 3.31 представлена діаграма Парето, на якій ефекти розташовані по спадаючій абсолютної величини значень. Дана діаграма показує, що максимальним достовірним впливом володіє концентрація лінійна сахарози, а мінімальним – квадратичний ефект фактору глюкози.

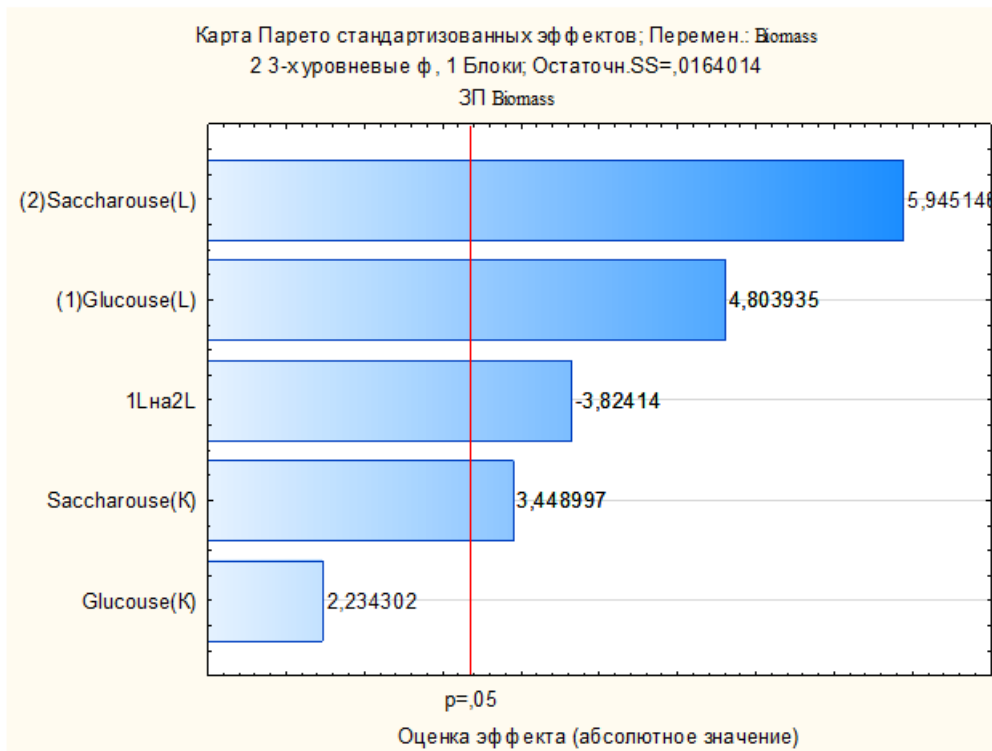


Рис. 3.32 Вплив досліджуваних факторів на приріст біомаси

У ході аналізу вихідних даних отримано рівняння регресії, яке має вигляд полінома з урахуванням тільки статистично достовірних ефектів: $Y = 1,38 + 0,5X_1 + 0,62X_2 + 0,31X_2^2 - 0,49X_1X_2$ (Рис. 3.33)

Оценки эффектов; R-кв.=,96772;Скор.,91392 (3**(2-0) полный факторный план, 1 блок (Таблица данных1) в Рабочая книга1
2 3-х уровневые ф, 1 Блоки; Остаточн.SS=,0164014
ЗП Biomass

Фактор	Эффект	Ст.Ош	t(3)	p	±95, %		Коеф.	Ст.Ош Коеф.	±95, %	
					Дов.Пред	Дов.Пред			Дов.Пред	Дов.Пред
Сред/Св.член	1,382611	0,042689	32,38775	0,000065	1,246755	1,518468	1,382611	0,042689	1,246755	1,518468
(1)Glucose(L)	0,502333	0,104567	4,80393	0,017170	0,169554	0,835112	0,251167	0,052284	0,084777	0,417556
Glucose(K)	0,202333	0,090558	2,23430	0,111550	-0,085862	0,490528	0,101167	0,045279	-0,042931	0,245264
(2)Saccharouse(L)	0,621667	0,104567	5,94515	0,009515	0,288888	0,954446	0,310833	0,052284	0,144444	0,477223
Saccharouse(K)	0,312333	0,090558	3,44900	0,040967	0,024138	0,600528	0,156167	0,045279	0,012069	0,300264
1L на 2L	-0,489750	0,128068	-3,82414	0,031485	-0,897319	-0,082181	-0,244875	0,064034	-0,448660	-0,041090

Рис. 3.33 Оцінка ефективності накопичення біомаси у вигляді рівняння регресії.

Оптимальні значення для приросту біомаси концентрація глюкози становить 7 г/л, сахарози 5 г/л(рис. 3.5).

Згідно поверхні відгуку приросту біомаси *Lactobacillus acidophilus* від досліджуваних факторів (глюкоза та сахароза) (рис. 3.34) негативний вплив має зменшення концентрації сахарози та глюкози в поживному середовищі. Але при надмірній концентрації ріст також пригнічується.

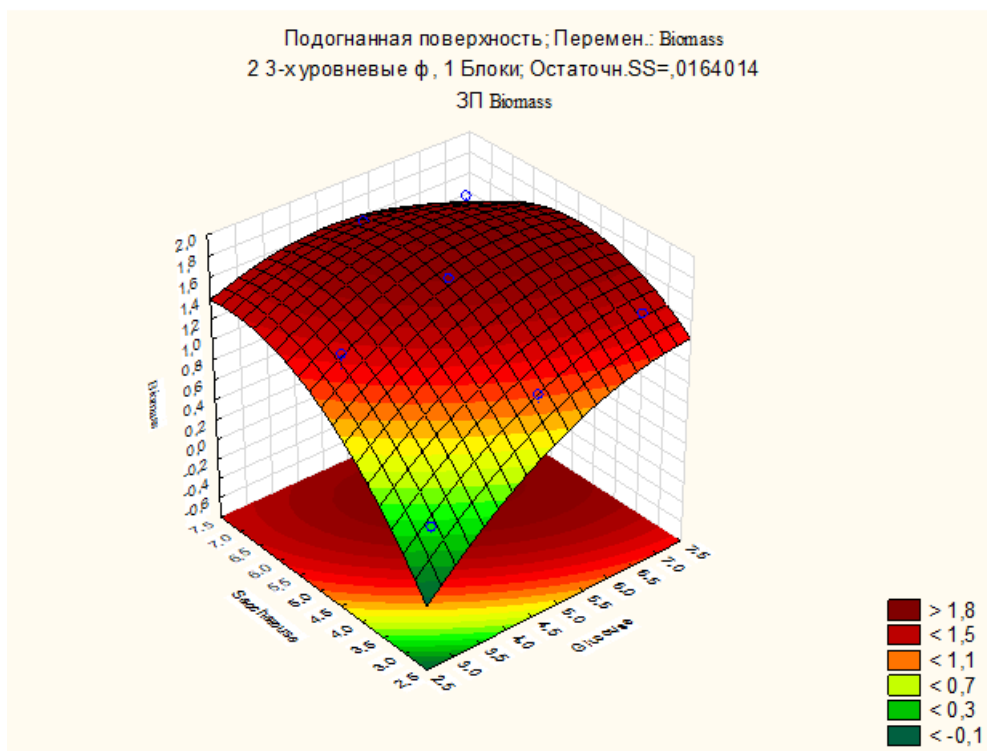


Рис. 3.34 Поверхня відгуку приросту біомаси від досліджуваних факторів (глюкоза та сахароза)

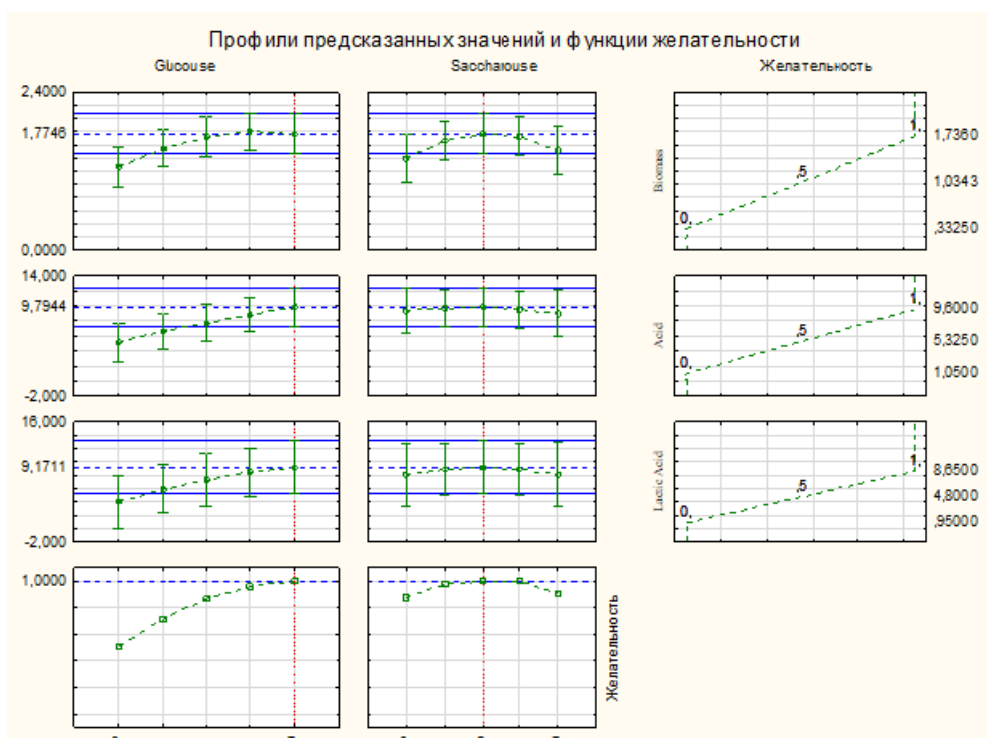


Рис. 3.35 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості біомаси (глюкоза та сахароза)

3.3.2 Аналіз результатів за загальною кислотністю з додаванням сахарози
Планування лабораторного дослідження з дослідження змін загальної кислотності проби, та варіанти поєднання чинників разом з одержаними результатами наведено в таблиці 3.13.

Таблиця 3.13

Матриця отриманих результатів загальна кислотність за титруванням

Варіант	Глюкоза X ₁	Сахароза X ₂	Пептон	NaCl	кількість кислоти, мл		
					1	2	середнє
варіант 1	3	3	6	5	1,20	0,90	1,05
варіант 2	3	5	6	5	6,50	6,10	6,30
варіант 3	3	7	6	5	7,40	6,50	6,95
варіант 4	5	3	6	5	5,90	6,20	6,05
варіант 5	5	5	6	5	6,60	7,10	6,85
варіант 6	5	7	6	5	9,10	9,50	9,30
варіант 7	7	3	6	5	9,60	9,60	9,60
варіант 8	7	5	6	5	9,70	9,50	9,60
варіант 9	7	7	6	5	9,10	8,90	9,00

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація сахарози, г/л.

Визначення рівня значущості ефектів (лінійного, квадратичного та ефекту взаємодії) показав, що концентрація глюкози (X1) має достовірний ($p \leq 0,05$) вплив на вплив рівню синтезу *Lactobacillus acidophilus* загальних кислот.

Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсійного аналізу (рис. 3.36).

Дисперсионный анализ; Прим.: Acid; R-кв.=,94166; Скор.,84442 (3**(2-0) полный факторный план, 1 блок (Таблица данных1) в Рабочая книга1) 2 3-х уровневые ф, 1 Блоки; Остаточн.SS=1,153426 ЗП Acid						
Фактор	SS	сс	MS	F	p	
(1)Glucose L+Q	32,40222	2	16,20111	14,04608	0,029971	
(2)Saccharouse L+Q	12,88389	2	6,44194	5,58505	0,097414	
1*2	10,56250	1	10,56250	9,15750	0,056484	
Ошибка	3,46028	3	1,15343			
Общая SS	59,30889	8				

Рис. 3.36 Результаты дисперсионного анализа (ANOVA) залежно від рівня синтезу загальних кислот (глюкоза та сахароза)

Виходячи з рис. 3.36, для візуальної оцінки побудовано діаграму Парето, де ефекти розміщено за спаданням абсолютної величини. З даної діаграми бачимо, що максимальний значущий ефект має лінійна концентрація глюкози та сахарози, мінімальний - квадратична концентрація глюкози.

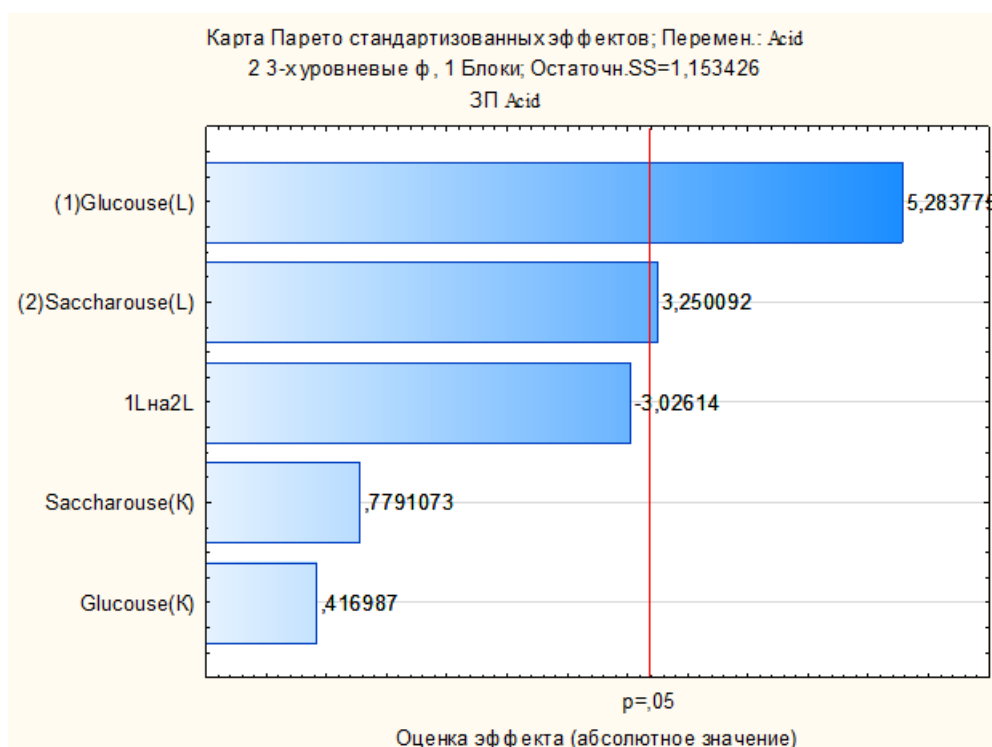


Рис. 3.37 Вплив досліджуваних факторів залежно від рівня синтезу загальних кислот.

Аналізуючи вихідні дані, було отримано рівняння регресії, яке має вигляд полінома, що враховує лише статистично значущі ефекти: $Y = 7,18 + 4,63X_1 + 2,85 X_2$ (рис. 3.38)

Оценки эффектов; R-кв.=,94166; Скор.,84442 (3**(2-0) полный факторный план, 1 блок (Таблица данных1) в Рабочая книга1 2 3-х уровневые ф, 1 Блоки; Остаточн. SS=1,153426 ЗП Acid										
Фактор	Эффект	Ст. Ош.	t(3)	р	-95, % Дов. Пред	+95, % Дов. Пред	Коэф.	Ст. Ош. Коэф.	-95, % Дов. Пред	+95, % Дов. Пред
Сред/Св. член	7,18889	0,357992	20,08113	0,000270	6,04960	8,328180	7,18889	0,357992	6,04960	8,328180
(1)Glucose(L)	4,63333	0,876898	5,28378	0,013222	1,84265	7,424015	2,31667	0,438449	0,92133	3,712008
Glucose(K)	0,31667	0,759416	0,41699	0,704729	-2,10013	2,733468	0,15833	0,379708	-1,05007	1,366734
(2)Saccharouse(L)	2,85000	0,876898	3,25009	0,047486	0,05932	5,640682	1,42500	0,438449	0,02966	2,820341
Saccharouse(K)	0,59167	0,759416	0,77911	0,492727	-1,82513	3,008468	0,29583	0,379708	-0,91257	1,504234
1L на 2L	-3,25000	1,073977	-3,02614	0,056484	-6,66787	0,167873	-1,62500	0,536988	-3,33394	0,083937

Рис. 3.38 Оцінка ефективності накопичення біомаси у вигляді рівняння регресії (глюкоза та сахароза)

За допомогою моделі показано, що концентрація глюкози має важливе значення для накопичення кислот у зразку і повинна зростати лінійно.

Оптимальними значеннями для показника загальної кислотності є концентрація глюкози 7 г/л та глюкози 5 г/л (рис. 3.40).

Згідно з поверхнею відгуку досліджуваних факторів (глюкози та сахарози) (рис. 3.9), зменшення концентрації як глюкози, так і сахарози в поживному середовищі має негативний вплив.

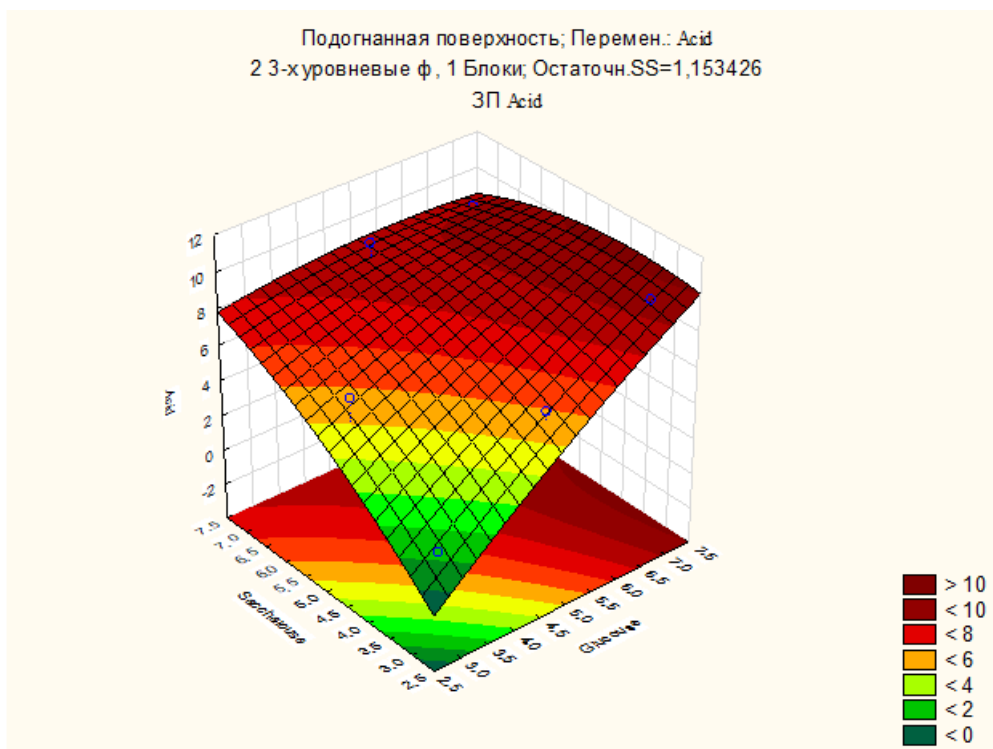


Рис. 3.39 Поверхня відгуку показника загальної кислотності від досліджуваних факторів (глюкоза та сахароза)

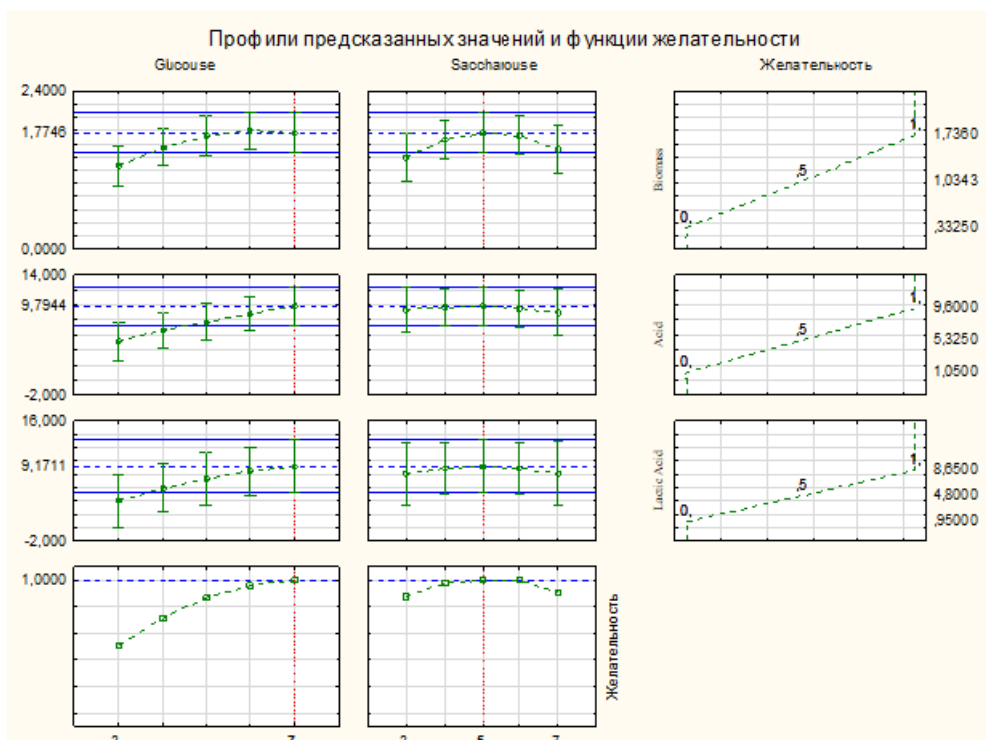


Рис. 3.40 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості загальних кислот (глюкоза та сахароза)

3.3.3 Аналіз результатів за молочною кислотою

Планування проведення лабораторного експерименту з вивчення виходу молочної кислоти, варіанти комбінації факторів і отримані результати наведені в таблиці 3.14.

Таблиця 3.14

Матриця отриманих результатів кількості молочної кислоти за титрування

Варіант	Глюкоза	Сахароза	Пептон	NaCl	кількість молочної кислоти,		
					мл		
					1	2	середнє
варіант 1	3	3	6	5	1,08	0,81	0,95
варіант 2	3	5	6	5	5,86	0,00	2,93
варіант	3	7	6	5	6,67	0,00	3,33

3							
варіант 4	5	3	6	5	5,31	5,58	5,45
варіант 5	5	5	6	5	5,95	6,40	6,17
варіант 6	5	7	6	5	8,20	8,56	8,38
варіант 7	7	3	6	5	8,65	8,65	8,65
варіант 8	7	5	6	5	8,74	8,56	8,65
варіант 9	7	7	6	5	8,20	8,02	8,11

Примітка:

X1 - Концентрація глюкози, г/л.

X2 - Концентрація пептону, г/л.

Визначення рівня значущості ефектів (лінійного, квадратичного та ефекту взаємодії) показав, що концентрація пептону(X2) та глюкози(X1) не має ($p \leq 0,05$) вплив на вплив на рівень синтезу *Lactobacillus acidophilus* молочної кислоти. Результати розрахунків представлені у вигляді таблиці дисперсійного аналізу (рис 3.41).

Дисперсионный анализ; Прм.: Lactic Acid; R-кв.=,85357;Скор.,60951 (3**(2-0) полный факторный план, 1 блок (Таблица данных1) в Рабочая книга1 2 3-х уровневые ф, 1 Блоки; Остаточн.SS=2,779304 3П Lactic Acid					
Фактор	SS	сс	MS	F	p
(1)Glucose L+Q	40,46669	2	20,23334	7,280005	0,070615
(2)Saccharouse L+Q	6,00416	2	3,00208	1,080155	0,443270
1*2	2,13160	1	2,13160	0,766955	0,445626
Ошибка	8,33791	3	2,77930		
Общая SS	56,94036	8			

Рис 3.41 Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) залежно від рівня синтезу молочної кислоти.

Для наочної демонстрації виконано побудову діаграми Парето, згідно якої ефекти розміщені в порядку убутання абсолютної величини. З цієї діаграми видно, що максимальний значущий ефект має лінійна концентрація глюкози, мінімальний - квадратична концентрація глюкози.

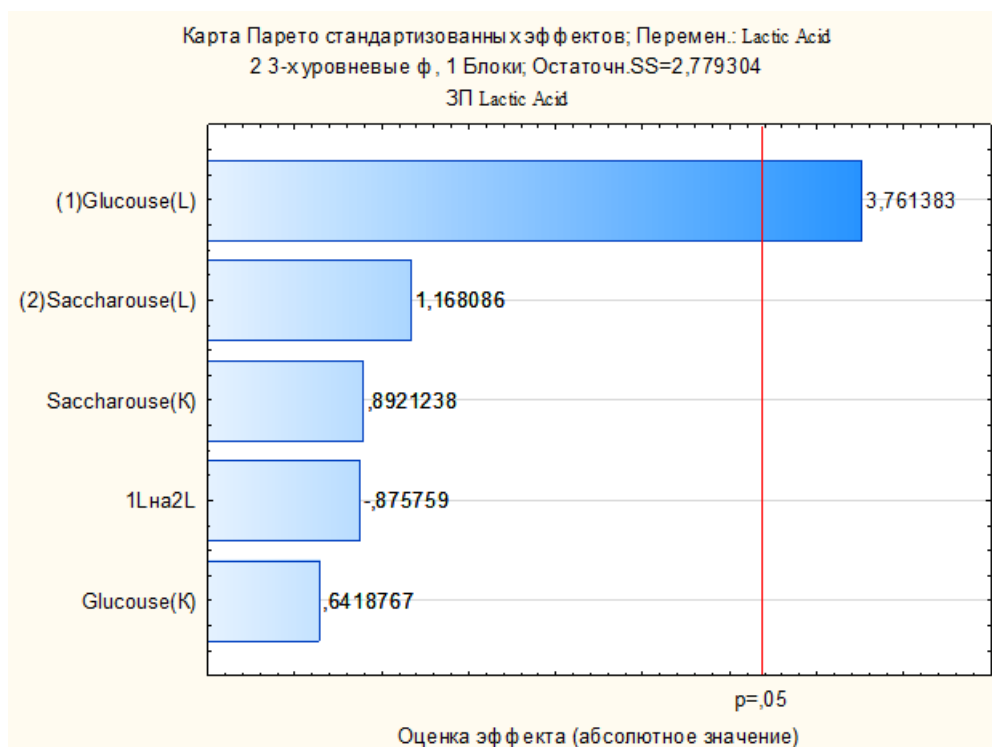


Рис. 3.42 Вплив досліджуваних факторів залежно від рівня накопичення молочної кислоти

При оцінці ефективності накопичення молочної кислоти у вигляді рівняння регресії було отримано результат де, $Y=6,16 + 5,12X_1$ (Рис 3.43)

Оценки эффектов; R-кв. =,85357; Скор.,60951 (3**(2-0) полный факторный план, 1 блок (Таблица данных1) в Рабочая книга1 2 3-х уровневые ф, 1 Блоки; Остаточн. SS=2,779304 ЗП Lactic Acid										
Фактор	Эффект	Ст. Ош.	t(3)	p	-95, % Дов. Пред	+95, % Дов. Пред	Коеф.	Ст. Ош. Коеф.	-95, % Дов. Пред	+95, % Дов. Пред
Сред/Св. член	6,16222	0,555708	11,08895	0,001571	4,39371	7,930733	6,162222	0,555708	4,39371	7,930733
(1)Glucose(L)	5,12000	1,361201	3,76138	0,032859	0,78805	9,451950	2,560000	0,680601	0,39402	4,725975
Glucose(K)	0,75667	1,178835	0,64188	0,566630	-2,99491	4,508246	0,378333	0,589417	-1,49746	2,254123
(2)Saccharouse(L)	1,59000	1,361201	1,16809	0,327159	-2,74195	5,921950	0,795000	0,680601	-1,37098	2,960975
Saccharouse(K)	1,05167	1,178835	0,89212	0,438054	-2,69991	4,803246	0,525833	0,589417	-1,34996	2,401623
1L на 2L	-1,46000	1,667124	-0,87576	0,445626	-6,76553	3,845534	-0,730000	0,833562	-3,38277	1,922767

Рис. 3.43 Оцінка ефективності залежно від рівня синтезу молочної кислоти у вигляді рівняння регресії (глюкоза та сахароза).

Згідно з моделлю, концентрація глюкози має важливе значення для збільшення виходу молочної кислоти і повинна збільшуватись лінійно.

Встановлено, що оптимальними значеннями для зростання синтезу молочної кислоти є концентрація глюкози 7 г/л та сахарози 5 г/л (рис. 3.45).

Відповідно до поверхні відгуку рівня синтезу молочної кислоти від досліджуваних факторів (рис. 3.44), зменшення концентрації глюкози поживному середовищі має негативний вплив.

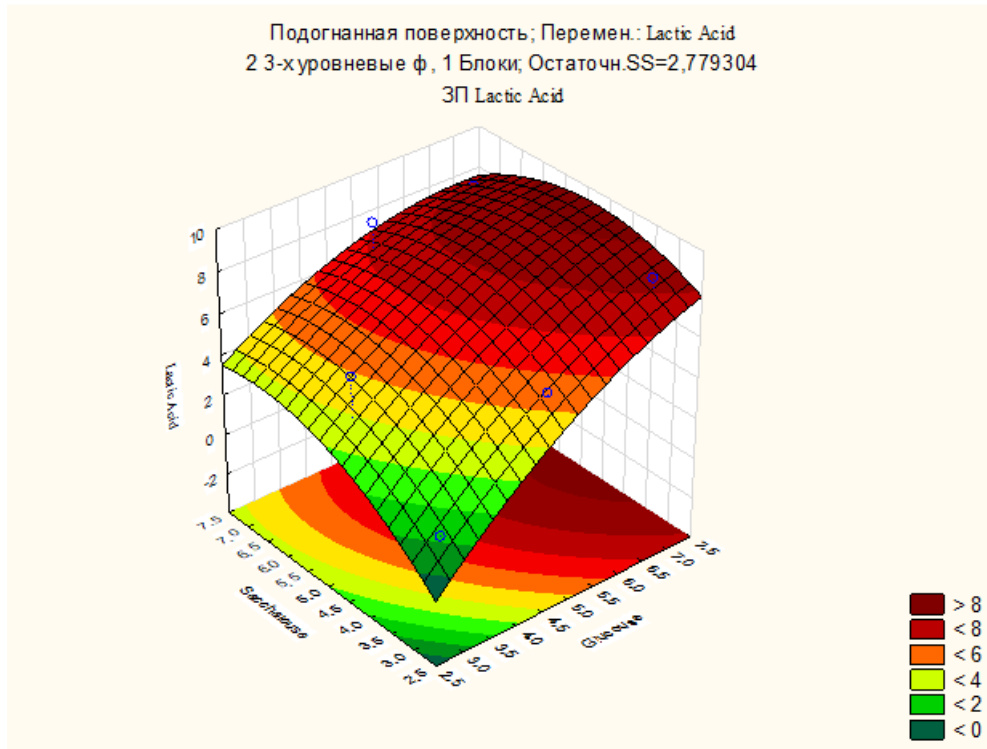


Рис. 3.44 Поверхня відгуку синтезу молочної кислоти від досліджуваних факторів (глюкоза та сахарози)

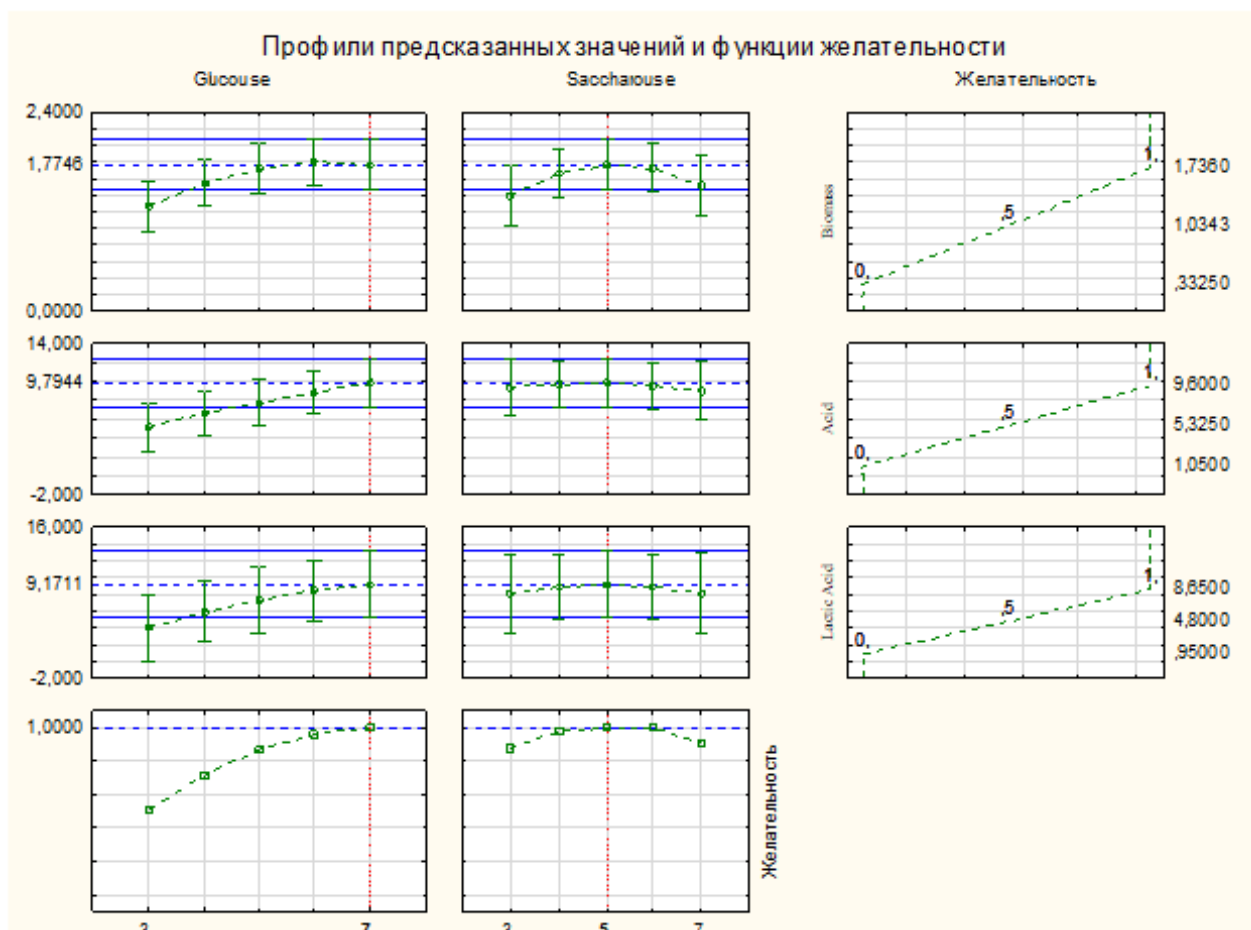


Рис 3.45 Профілі прогнозованих значень факторів для отримання максимальної кількості синтезу молочної кислоти (глюкоза та сахароза)

Висновки до розділу 3

Побудували матрицю планування повного факторного експерименту по двом факторам (джерело вуглецю та азоту) та визначити оптимальні умови культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 на середовищі ГПС для накопичення біомаси, кількості життєздатних клітин, кількості виходу молочної кислоти та показника загальної кислотності.

Встановлено, що оптимально вносити у середовище 10 г/ глюкози та 6 г/л пептону. Про що свідчать наведені діаграми і графіки.

Після досліджували вплив двох змішаних субстратів вуглецю (глюкоза та сахароза) в різних концентраціях на накопичення біомаси, кількості життєздатних клітин, кількості виходу молочної кислоти та показника загальної кислотності. Встановлено, що на накопичення біомаси та загальної кислотності важливим є, як кожне джерело окремо так і їх співвідношення. Найкращі результати були при внесенні 5 г/л глюкози та 7 г/л сахарози.

Всі результати були обраховані за допомогою комп'ютерної програми аналізу даних ANOVA. За результатами статистичного аналізу підібрано оптимальні концентрації для накопичення біомаси, кількість виходу молочної кислоти, та показника загальної кислотності. Побудовані поверхні відгуку та профілі прогнозованих значень факторів.

ВИСНОВКИ

Оптимізація середовища потребує проведення великої кількості експериментів незалежно від обраного середовища, що пов'язано з трудозатратами і є незамкненим експериментом. Конструювання середовища для ферментації може бути нескінченною проблемою, оскільки кінцева точка, наприклад, вихід, є довільною величиною, яка залежить від різних інших факторів. В роботі в якості дослідного матеріалу було використано ліофілізований штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691, наданий для проведення наукових досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

При культивуванні *Lactobacillus acidophilus* використовували такі поживні середовища: ГПС (глюкозо-пептонне), ГПС (глюкозо-пептонне): ГПС (глюкозо-пептонне середовище) та МРС (Ман, Рогоза, Шарпа). При аналізі зразків використовували такі методики аналізу, як кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера, спектрофотометричне дослідження наростання біомаси, встановлення загальної кислотності зразка титруванням. Розрахунки, графіки, гістограми виконані за використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel 2013.

Оцінку приросту біомаси *L.acidophilus* здійснювали з застосуванням методів регресійного аналізу в теорії планування експерименту за повнофакторним 3^2 планом. Статистичну опрацювання результатів планового експерименту (розрахунок коефіцієнтів регресії, дисперсійний аналіз (ANOVA) та побудову поверхонь відгуку) проводили за допомогою пробної версії програми Statistica (TIBCO Software Inc., <https://www.tibco.com/>) з використанням бібліотеки DOE.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dubey K. K., Ray A. R., Behera B. K. Production of demethylated colchicine through microbial transformation and scale-up process development. *Process Biochemistry*. 2008. Vol. 43, no. 3. P. 251–257.
2. Optimization of actinomycin V production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm / V. Singh et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009. Vol. 82, no. 2. P. 379–385.
3. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity / P. Rajeswari et al. *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 5.
4. Gupte M., Kulkarni P. A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp MTCC 3340 using full factorial design. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2003. Vol. 78, no. 6. P. 605–610.
5. Franco-Lara E., Link H., Weuster-Botz D. Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm. *Process Biochemistry*. 2006. Vol. 41, no. 10. P. 2200–2206.
6. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology / Y. Wang et al. *Microbial Cell Factories*. 2011. Vol. 10, no. 1. P. 98.
7. Shih I. L., Van Y. T., Chang Y. N. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002. Vol. 31, no. 3. P. 213–220.
8. Singh N., Rai V., Tripathi C. K. M. Production and optimization of oxytetracycline by a new isolate *Streptomyces rimosus* using response surface methodology. *Medicinal Chemistry Research*. 2011. Vol. 21, no. 10. P. 3140–3145.
9. Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment / H. Chen et al. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2015. Vol. 14, no. 3. P. 227–232.
11. Fisher R. A. Design of Experiments. *BMJ*. 1936. Vol. 1, no. 3923. P. 554.

13. Аністратенко В. О., Федоров В. Г. Математичне планування експериментів в АПК. Київ: Вища школа, 1993. 375 с.
14. Gupte M., Kulkarni P. A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp MTCC 3340 using full factorial design. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2003. Vol. 78, no. 6. P. 605–610.
15. Vaidya R., Vyas P., Chhatpar H. S. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. Vol. 33, no. 1. P. 92–96.
16. Singh, N., and Rai, V. Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh: *Int. J. Phar. Pharm. Sci.* 2012. Vol. 4. P. 94–101.
17. Production, purification and characterization of cholesterol oxidase from a newly isolated *Streptomyces* sp. / R. Niwas et al. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 29, no. 11. P. 2077–2085.
18. Vaidya R., Vyas P., Chhatpar H. S. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. Vol. 33, no. 1. P. 92–96.
20. Vaidya R., Vyas P., Chhatpar H. S. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. Vol. 33, no. 1. P. 92–96.
21. Ghanem N. B., Yusef H. H., Mahrouse H. K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Bioresource Technology*. 2000. Vol. 73, no. 2. P. 113–121.
22. Singh V., Tripathi C. K. M. Production and statistical optimization of a novel olivanic acid by *Streptomyces olivaceus* MTCC 6820. *Process Biochemistry*. 2008. Vol. 43, no. 11. P. 1313–1317.

23. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity / P. Rajeswari et al. *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 5.

24. Adinarayana, K., & Ellaiah, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp.: *J Pharm Sci*, 2002. Vol. 5. no. 3. P. 272-278.

25. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells / P. L. Castro et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992. Vol. 38, no. 1.

26. Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete / J. Banga et al. *Medicinal Chemistry Research*. 2007. Vol. 17, no. 2-7. P. 425–436.

27. Pignatiello, J. J. An Overview of the Strategy and Tactics of Taguchi. *IIE Transactions*. 1988. Vol. 20, no. 3. P. 247–254.

28. Taguchi's experimental design for optimizing the production of novel thermostable polypeptide antibiotic from *Geobacillus pallidus* SAT4 / Muhammad, S. A., Ahmed, S., Ismail, T., and Hameed, A. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014. P. 11–23.

29. Aggarwal A., Singh H. Optimization of machining techniques – A retrospective and literature review. *Sadhana*. 2005. Vol. 30, no. 6. P. 699–711.

30. Chanin M. N., Kuei C.-H., Lin C. Using Taguchi design, regression analysis and simulation to study maintenance float systems. *International Journal of Production Research*. 1990. Vol. 28, no. 11. P. 1939–1953.

31. Zhang J., Gao N.-f. Application of response surface methodology in medium optimization for pyruvic acid production of *Torulopsis glabrata* TP19 in batch fermentation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2007. T. 8, № 2. C. 98–104.

32. Bhagat, P. An introduction to neural nets: *Chemical engineering progress*, 1990. Vol. 86, no. 8. P. 55-60.

33. Nelson M. M. A practical guide to neural nets. Reading, Mass : Addison-Wesley, 1991. 344 p.

34. Foster J. W., Katz E. Control of Actinomycin D Biosynthesis in *Streptomyces parvullus*: Regulation of Tryptophan Oxygenase Activity. *Journal of Bacteriology*. 1981. Vol. 148, no. 2. P. 670–677.

35. Optimization of actinomycin V production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm / V. Singh et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009. Vol. 82, no. 2. P. 379–385.

36. Modelling of nutrient mist reactor for hairy root growth using artificial neural network / Osama, K., Somvanshi, P., Pandey, A. K., & Mishra, B. N. *Eur J Sci Res*, 2013. Vol. 97, no. 4. P. 516-526.

37. Maximizing the native concentration and shelf life of protein: a multiobjective optimization to reduce aggregation / S. Khan et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 89, no. 1. P. 99–108.

38. Кислота молочна. фармацевтична енциклопедія: веб-сайт. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/7010/kislota-molochna>

39. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect / J.-C. Wang та ін. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. Т. 67, № 6. С. 759–766. 40. Axelsson, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology: Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker, 2004. Vol. 139. P. 1 – 66.

41. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013. Vol. 31, no. 6. P. 877–902.

42. Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology / M. B. Pedersen et al. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2012. Vol. 3, no. 1. P. 37–58.

43. Assessment of Aerobic and Respiratory Growth in the *Lactobacillus casei* Group / T. Zotta et al. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 6. P. e99189.

44. Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups / A. Ricciardi et al. *Journal of Applied Microbiology*. 2015. Vol. 119, no. 3. P. 776–785.

45. Hammes W. P., Hertel C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*. New York, NY, 2006. P. 320–403.

46. Бондар, І. В.; Гуляєв, В. М. Промислова мікробіологія Харчова і агробіотехнологія: Навчальний посібник для студентів спеціальності, 2004. 7 с.

47. Hofvendahl K., Hahn–Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. Vol. 26, no. 2-4. P. 87–107.

48. Srivastava A., Narayanan N., Roychoudhury P. K. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004. Vol. 7, no. 2.

49. Buchta, K. Organic acids of minor importance. *Biotechnology, Weinheim*, 1983. Vol. 3, P. 467 – 478.

50. Lazic, Z. R. Design of experiments in chemical engineering: a practical guide. VCH, Weinheim, 2004. P. 350–360.

51. Lazic Z. R. Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide. Wiley-VCH, 2005. P 350– 360.

52. Bioutilisation of whey for lactic acid production / P. Panesar et al. *Food Chemistry*. 2007. Vol. 105, no. 1. P. 1–14.

53. Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for l(+)-lactic acid production from whey / P. S. Panesar et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007. Vol. 74, no. 1. P. 35–42.

54. Teuber M. *Lactic Acid Bacteria*. *Biotechnology*. Weinheim, Germany, 2008. P. 325–366.

55. Sanders M. E., Klaenhammer T. R. Invited Review: The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *Journal of Dairy Science*. 2001. Vol. 84, no. 2. P. 319–331.

56. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM / E. Altermann et al. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. Vol. 102, no. 11. P. 3906–3912.
57. Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum* / A. Wegkamp et al. Letters in Applied Microbiology. 2010. Vol. 50, no. 1. P. 57–64.
58. The scale up of mycelial shake flask fermentations: A case study of gamma linolenic acid production by *Mucor hiemalis* IRL 51 / M. J. Kennedy et al. Journal of Industrial Microbiology. 1994. Vol. 13, no. 4. P. 212–216.
59. O’Kennedy R. D., Ward J. M., Keshavarz-Moore E. Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2003. Vol. 37, no. 1. P. 83.
60. Gupta A., Rao G. A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. Biotechnology and Bioengineering. 2003. Vol. 84, no. 3. P. 351–358.
61. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health / T. R. Klaenhammer et al. FEMS Microbiology Reviews. 2005. Vol. 29, no. 3. P. 393–409.
62. Shah R., Ward P. T. Defining and developing measures of lean production. Journal of Operations Management. 2007. Vol. 25, no. 4. P. 785–805.
63. Archibald F. S., Fridovich I. Manganese and Defenses against Oxygen Toxicity in *Lactobacillus plantarum*. Journal of Bacteriology. 1981. Vol. 145, no. 1. P. 442–451.
64. Similarity and Differences in the *Lactobacillus acidophilus* Group Identified by Polyphasic Analysis and Comparative Genomics / B. Berger et al. Journal of Bacteriology. 2006. Vol. 189, no. 4. P. 1311–1321.
65. Irkitova, A.N., Matsyura, A.V. Ecological and biological characteristics of *Lactobacillus acidophilus*: Ukrainian Journal of Ecology, 2017. Vol. 7, no. 4. P. 214–230.

66. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 1960. Vol. 23, no. 1. P. 130–135.

67. Rogosa M., Mitchell J. A., Wiseman R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology*. 1951. Vol. 62, no. 1. P. 132–133.



The 9th International Conference on Advanced Materials and Systems
-ICAMS 2022-
26-28 October 2022, Online Event

Bucharest, October 6th, 2022

CONFIRMATION OF PAPER ACCEPTANCE

Dear Maryna Rohova,

We are pleased to inform you that your paper *Green Biosynthesis of Zinc Nanoparticles*, authors **Maryna Rohova, Vladyslav Kovalenko, Volodymyr Tkachenko, Inna Lych, Iryna Voloshyna**, was accepted for presentation in the 9th International Conference on Advanced Materials and Systems which will be held online, on October 26th – 28th, 2022.

A tentative program of the Conference will be soon posted on the conference website.

We thank you for making this conference a challenging, interesting and enjoyable event! We look forward to seeing you online, on October 26th – 28th, 2022.

On behalf of the ICAMS 2022 Scientific Committee,

Dr. Laurenția Alexandrescu

Chair - Organizing Committee of the 9th International Conference on Advanced Materials and Systems



Organized by
INCDTP - Division: Leather and Footwear Research Institute
93 Ion Minulescu St., 030215, Bucharest, Romania
Phone/Fax: +4021.323.52.80
www.icams.ro www.icpi.ro



ДОДАТОК Б

**Біосинтез наночастинок титану за допомогою мікроорганізмів
Рогова М.Р., Коваленко В.І., Зурнаджан А.А., Волошина І.М.**

Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна

Вступ. Оскільки такі частинки за величиною наближені до молекул, наноматеріали здатні виявляти унікальні фізичні та хімічні властивості, близькі властивостям окремих молекул. Нанометровий діапазон вимірювань розмірів 1÷100 нм відкриває нові властивості та галузі застосування речовин та матеріалів [3].

Для синтезу металевих наночастинок можна використовувати різноманітні хімічні та фізичні методи. Однак вони пов'язані з багатьма проблемами, включаючи використання токсичних розчинників, утворення небезпечних побічних продуктів і високе споживання енергії. Більшість методів синтезу знаходяться на стадії розробки: у результаті часто виникають проблеми зі стабільністю наночастинок, контролем росту та агрегацією [4, 5, 12].

Відповідно, існує суттєва потреба в розробці безпечних для навколишнього середовища процедур для синтезу металевих наночастинок. Нещодавно з'явився новий метод синтезу наноматеріалів за допомогою високоструктурованої біосинтетичної активності мікробної клітини. Мікробний синтез наночастинок є підходом зеленої хімії, яка поєднує нанотехнології та мікробну біотехнологію. Завдяки біорізноманітності мікробів, їх потенціал як біологічних матеріалів для синтезу наночастинок ще не повністю досліджено. Процеси взаємодії між мікроорганізмами і металами вже використовуються в біотехнологічних процесах, таких як біомінералізація, біоремедіація та мікробна корозія [5, 12].

В останнє десятиліття використання мікробів викликало підвищений інтерес, до якого було проведено багато досліджень з використанням різних моделей мікроорганізмів. Доречним є застосування бактеріальних культур для біосинтезу наночастинок металів, оскільки бактеріям властива здатність відновлювати іони важких металів, пригнічувати їх токсичність та рости при високих концентраціях сполук. Біологічний синтез з використанням бактеріальних мікроорганізмів має перевагу перед рослинами, оскільки бактерії легко розмножуються. Мікроби діють як крихітна нанофабрика у відновленні іонів металів до металевих НЧ із залученням ферментів та інших біомолекулярних сполук, що виділяються або виробляються мікробами. Ці численні органічні компоненти, що виділяються в суспензію або середовище для росту, пов'язані з утворенням різних розмірів, форм із моно- та полідисперсними наночастиками. Білок, що виділяється з мікробів, може діяти як блокуючий агент, який надає стабільність утворенню наночастинок. Ріст усіх бактерій в першу чергу залежить від вуглецю, азоту, неорганічних іонів і органічних матеріалів. Основні види бактерій які використовуються для синтезу металевих наночастинок включають *Acinetobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus* spp., *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* sp. і *Pseudomonas* sp [13, 14, 16].

Мета дослідження. Провести літературний пошук та аналіз досліджень біосинтезу титану з використанням мікроорганізмів.

Методи та об'єкти дослідження. Аналіз масиву наукових досліджень.

Основні результати. Бактеріальні екстракти були використані для створення зеленого виробництва наночастинок TiO_2 . Бактеріальні метаболіти відіграють ключову роль у біовідновленні та стабільності TiO_2 . Наночастки TiO_2 , які в природі існують у трьох різних кристалічних формах анатазу, рутилу та брукіту, можна отримати за допомогою біологічного агента. Екстракт *Aeromonas hydrophila* використовувався для отримання наночастинок титану розміром 28–54 нм. У ході дослідження продемонстровано ефективну пригнічувальну дію проти *Staphylococcus aureus* (зона інгібування 33 мм) і *S. pyogenes* (зона інгібування 31 мм) [7].

З одного боку, наночастки TiO_2 виготовлені з використанням бактерії *Lactobacillus* під час комбінованої дії ферментів оксидоредуктази та глюкози при помірному рН, тоді як, з

іншого боку, їх можлива патогенність і важке бактеріальне виробництво мають мінімальні можливості для комерціалізації [9].

Екстракти *Aspergillus flavus* здатні відновлювати іони титану до наночасток оксиду титану. В результаті синтезовано окремі наночастки, так і нечисленні агрегати розміром 62–74 нм. Ці наночастки показали сильні результати антибактеріальну дію проти *E. coli* [15].

Наночастки діоксиду титану, синтезовані з титану як попередника з використанням бактерії *Bacillus subtilis* були охарактеризовані та підтверджені як наночастки TiO_2 за допомогою УФ-спектроскопії, XRD, FTIR, AFM та SEM аналізу. Виявлено морфологічні характеристики сферичної, овальної форми, окремих наночасток, а також окремих агрегатів розміром 66–77 нм. Дослідження в УФ-видимому діапазоні, яке виявило поверхневий плазмонний резонанс при 366 нм. XRD показує кристалографічну площину анатазу наночасток TiO_2 , вказуючи на те, що структура наночасток переважно відповідає кристалічному діоксиду титану [1].

Досліджено вплив діоксиду титану на 100 штамів нативних лактобацил. У зразках штамів, котрі здібні синтезувати наночастки титану колір розчину змінився зі світло-коричневого на темно-коричневий. Тоді як нездатні до біосинтезу штами продемонстрували відсутність зміни кольору. Позаклітинний опосередкований біосинтез наночасток титану *Lactobacillus* в MRS-бульйоні показав результати: розмір наночасток титану становить 150 нм, форма сферична [2].

Є відомості про синтез наночасток TiO_2 з використанням *Fusarium oxysporium*, *Saccharomyces cerevisiae* і *Lactobacillus* sp. Вони синтезують наночастки TiO_2 розміром 30 і 18 нм відповідно. Для визначення утворення наночасток TiO_2 виконуються рентгенівський і просвічуючий електронний мікроскопічний аналіз. Виявлено, що джерело енергії, рН і загальний окислювально-відновлювальний потенціал є важливими факторами в синтезі наночасток TiO_2 [8]. Встановлено, що наночастки діоксиду титану, синтезовані завдяки *Lactobacillus crispatus*, зменшують утворення біоплівки, гемолізіну та уреазі, які відповідають за розвиток стійкості патогенів до множинних лікарських засобів [6].

Проведено численні дослідження, щоб з'ясувати, як наночастки TiO_2 , що використовуються для бактерицидних цілей, впливають на клітини бактерій. Такі бактерії як *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus hirae* і *Bacteroides fragilis* були вбиті ефектами наночасток TiO_2 під дією ультрафіолетового світла [17].

Bacillus amyloliquefaciens застосовується для синтезу кристалітів біосинтезованих наночасток титану, розмір яких знаходиться в діапазоні 15,23–87,6 нм. Фур'є-спектроскопія встановила переконливі докази наявності білків у некальцинованих наночасток діоксиду титану для стабілізації та запобігання агломерації частинок [10].

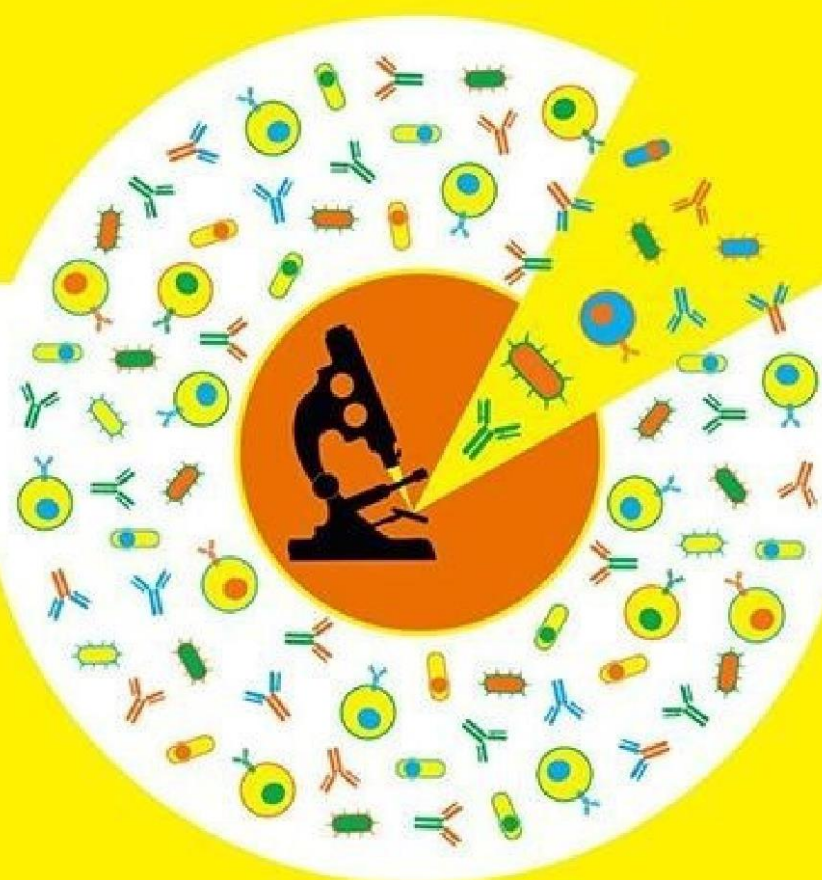
Висновки. Наука та техніка наносистем є однією з них найскладніших та найшвидше розвиваючих галузей нанобіотехнологій. В даний момент зростає потреба в розвитку екологічно чистого процесу синтезу наночасток, під час якого не використовують токсичні хімікати. Саме тому, важливим напрямком досліджень у нанотехнологіях є синтез металевих наночасток мікроорганізмами, такими як бактерії та дріжджі (детоксикація часто відбувається шляхом відновлення металу іонів/утворення сульфідів металів). Бактерії є організмом вибору завдяки їх швидкому росту, високій ефективності і невеликій вартості. Наночастки металів виявляють антимікробні ознаки, однак властивості наночасток залежать від їх розміру та форми, що робить їх специфічними для різних застосувань. Тим не менш, бажаний розмір і форму наночасток можна отримати за допомогою оптимізації процесу синтезу шляхом маніпулювання умовами їх реакції. Опосередкований мікробами синтез наночасток є альтернативою хімічним і фізичним методам, оскільки є нетоксичним та біосумісним. Незважаючи на актуальність застосування методу «зеленого синтезу» у сфері нанотехнологій, біосинтез за рахунок бактеріальних організмів має певні недоліки, такі як висока ймовірність патогенності, трудомістке культивування та проблеми з забрудненням.

Зрештою, існує потреба дослідити більше потенційних мікроорганізмів для синтезу наночасток металів [11].

Список літератури

1. Vishnu Kirthi A., Abdul Rahuman A., Rajakumar G., Marimuthu S., Santhoshkumar T., et. al. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. *Materials Letters*. 2011, 65 (17–18): 2745-2747. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.05.077>.
2. Voloshyna I.M., Shkotova L.V. et.al. *Lactobacillus* bacteria: biological and therapeutic properties. *Mikrobiol. Z.* 2019; 81(6): 131-146. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj81.06.131>. (in Ukrainian).
3. Baraton M.-I., et. al. Synthesis, functionalization and surface treatment of nanoparticles. *Amer Scientific Pub*, 2003, 9.
4. Brust M., Kiely C.J., Colloids and Surfaces A. *Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, 202: 175–186.
5. Huang H., Yang X., Colloids and Surfaces A, *Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005, 255: 11–17.
6. Kawther Hkeem I., Sattar Salman J. A., Abodi Ali F. Effect of titanium nanoparticles biosynthesis by *Lactobacillus crispatus* on urease, hemolysin & biofilm forming by some bacteria causing recurrent UTI in Iraqi women. *European Scientific Journal*, 2014, 10.9.
7. Jayaseelan C., Rahuman A.A., Roopan S.M., Kirthi A.V., Baraton M.-I., et. al. Biological approach to synthesize TiO₂ nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013, 107: 82-9. doi: 10.1016/j.saa.2012.12.083.
8. Jha A, Prasad K, Kulkarni A Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms. *Coll Surf B: Biointerfaces*. 2009, 71: 226-229.
9. Рогова М.Р., Коваленко В.І., Волошина І.М. Використання наночасток оксиду титану та оксиду цинку як сонцезахисних фільтрів // XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2022», 10–11 жовтня 2022 року, Житомир, ПП «Євро-Волинь», 2022. – Р. 226-229.
10. Khan R, Fulekar M. H.. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* culture and enhancement of its photocatalytic activity for the degradation of a sulfonated textile dye Reactive Red 31. *Journal of colloid and interface science*. 2016, 475: 184-191. doi: 10.1016/j.jcis.2016.05.001.
11. Kowshik M., Ashtaputre S., Kharrazi S., Vogel W., Urban J., Kulkarni S.K., Paknikar K.M. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology*. 2003, 14: 95-101. doi:10.1088/0957-4484/14/1/321.
12. Mandal S., Phadtare S., Sastry M. Interfacing biology with nanoparticles. *Current Applied Physics*. 2005, 5: 1127–1218.
13. Mohanpuria Prashant, Nisha K. Rana, Sudesh Kumar Yadav. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of nanoparticle research*. 2008, 10.3: 507-517.
14. Voloshyna I.M., Soloshenko K.I., Krasinko V.O., et.al. Bacteriocins *Lactobacillus* — an alternative to antimicrobial drugs // *Biopolymers and Cell*, 2021, 37(2), PP. 85–97
15. Rajakumar G., Rahuman A.A., Roopan S.M., Khanna V.G., Elango G. et.al. Fungusmediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012, 91: 23–29, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.011>.
16. Siavash Irvani Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status and Future Prospects. *International Scholarly Research Notices*. 2014, Article ID 359316, 18 p.
17. Tsuang Y.-H., Sun J.-S., Huang Y.-C., Lu, C.-H., et.al. Studies of Photokilling of Bacteria Using Titanium Dioxide Nanoparticles. *Artif. Organs* 2008, 32: 167–174, <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2007.00530.x>.

IV international scientific conference
**MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY -
THE DEVELOPMENT OUTLOOK
IN THE 21st CENTURY**



ABSTRACT BOOK

Kyiv
2022

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE

TARAS SHEVCHENKO NATIONAL UNIVERSITY OF KYIV
ESC «INSTITUTE OF BIOLOGY AND MEDICINE»
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

VYNOGRADS'KYJ SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS OF UKRAINE

UKRAINIAN SOCIETY OF SPECIALISTS IN IMMUNOLOGY, ALLERGOLOGY AND
IMMUNOREHABILITATION
THE EUROPEAN FEDERATION OF IMMUNOLOGICAL SOCIETIES

IV International Scientific Conference
Microbiology and Immunology –
the development outlook in the 21st century

ABSTRACTS BOOK

(SEPTEMBER 22-23, 2022, KYIV)

KYIV 2022

Kyiv, 22-23 of September, 2022

MAIN PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS FERMENTUM*

Rohova M.¹, Kovalenko V.¹, Shkotova L.², Voloshyna I.^{1,3}

¹National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine;

²Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine;

³National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine.

Lactobacillus fermentum is Gram-positive facultative anaerobic bacteria of the *Lactobacillaceae* family. Bacteria of this species have high biological and functional activity, which determines their practical use as pharmaceuticals and biologically active food supplements.

L. fermentum is used in the industrial food production as an additional culture to enrich the products with probiotic microflora and regulate microbiological processes. In the manufacture of enzymatic cheeses and in industrial baking *L. fermentum* bacteria are used to maintain high organoleptic properties. *L. fermentum* is also used in the making of high-quality silage. Recent studies have shown that *L. fermentum* is able to ferment dietary fiber and release short-chain fatty acids, including propionic, butyric, acetic, and lactic acids, in the intestine. Oral administration of *L. fermentum* can improve glucose metabolism and regulate the generation of innate and adaptive immune cells.

The culture liquid of *L. fermentum* is enriched with B vitamins, biotin, PP, folic acid, tocopherol, ascorbic acid. This contributes to the use of these lactobacilli for the prevention and treatment of dysbiosis, infectious diseases, peptic ulcer disease associated with the presence of *Helicobacter pylori*, campylobacteriosis, anaerobic vaginosis, stomatitis, enterovirus infections.

L. fermentum has been shown to interact with human immune cells and to modulate specific pathways involved in innate and adaptive immunity in various inflammatory diseases. There are the data about its positive effect on the body immune system and metabolism. *L. fermentum* bacteria synthesize amino acids, enzymes, immunoglobulins, stimulate the phagocytic activity of neutrophils, macrophages, interferons, interleukins and tumor necrosis factor on the immune system. *L. fermentum* bacteria are resistant to lysozyme and produce lysozyme, which in combination with lysozyme of the intestinal mucosa contributes to the resistance of the latter to pathogenic microflora. The function of this species is to model the formation of anti-inflammatory cytokine IL-10 and reduction of the level of inflammatory mediators IL-2, -5, -6, as well as tumor necrosis factor TNF- α . *L. fermentum* is actively involved in metabolic and regulatory processes and is used to develop probiotic preparations and food products. The main properties of *L. fermentum* are its pronounced antagonism against pathogenic microorganisms, the ability to suppress the development of bacteria of other species and strains, resistance to a spectrum of antibacterial agents, and direct participation in maintaining homeostasis in humans and animals.

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, immune system, industrial food production.



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЖИТОМИРСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАН УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЗООЛОГІЇ ІМ. І. І. ШМАЛЬГАУЗЕНА НАН УКРАЇНИ
ГІДРОЕКОЛОГІЧНЕ ТОВАРИСТВО УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКЕ НАУКОВЕ ТОВАРИСТВО ПАРАЗИТОЛОГІВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА

БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ – 2022

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

*За матеріалами
XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції
від 10–11 жовтня 2022 р.*

Житомир
Видавць ПП «Свро-Волинъ»
2022

носії, наповнені лікарськими засобами, переваги перед вже існуючими або альтернативними системами доставки ліків.

Література

1. Rhamnolipids: production, performance, and application. Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: production of fuels and chemicals / Tiso T. et al. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. 2017. P. 1–37. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-31421-1_388-1.

2. Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery / Müller F. et al. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017. 116. P. 31–37.

3. Тіосульфонати – шляхи їх синтезу та перспективи застосування / Н. Я. Менька та ін. *Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія*: зб. тез Міжн. наук.-пр. конф., присв. 90-р. Київського національного університету технологій та дизайну каф. біотехнології, шкіри та хутра, 14–15 травня 2020. Київ : КНУТД, 2020. С. 42.

4. Чекман І. С. Нанофармакологія: погляд на проблему. *Вісник Національної академії наук України*. 2012. № 7. С. 21–25.

5. Шірінян А. С., Макара В. А. Актуальні проблеми наноматеріалів і нанотехнологій. *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. 2010. Т. 8, № 2. С. 223–269.

УДК 601+606:61

ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТОК ОКСИДУ ТИТАНУ ТА ОКСИДУ ЦИНКУ ЯК СОНЦЕЗАХИСНИХ ФІЛЬТРІВ

М. Р. Рогова, В. І. Коваленко, І. М. Волошина

Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Немировича-Данченка, 2, Київ, 01011, Україна

Мінеральні сонцезахисні засоби виготовляються з діоксиду титану та оксиду цинку, зазвичай у формі наночастинок. Завдяки невеликим розмірам наночастинок краще відбивають і розсіюють УФ-промені. Оптимальні розміри для частинок оксиду цинку – 20–30 нм, діоксиду титану – 60–120 нм. При створенні сонцезахисних засобів використовують наночастинок розміром від 14 нм до мікронів для титану діоксиду та від 30 до 200 нм для цинку оксиду [1].

Різниця між цими двома неорганічними фільтрами полягає в тому, що TiO_2 в основному відображає ультрафіолет спектру В і запобігає сонячному опіку, в той час як ZnO більшою мірою відображає ультрафіолет спектру А, попереджаючи старіння шкіри.

Сполуки оксиду цинку та діоксиду титану можуть викликати подразнення шкіри або алергію. Для того, щоб зменшити побічні ефекти та мінімізувати фотодеградацію, використовується інкапсуляція цих сполук у ліпідні наночастинок. Косметичні засоби на основі наночастинок мають прозору

структуру, слабкий запах, менш слизькі та в'язкі властивості, тому забезпечують рівномірне нанесення та краще проникнення в шкіру [4].

При застосуванні наночастинок металів оксиду титану (TiO_2) та оксиду цинку (ZnO) як фільтрів випромінювання, можна досягти високого рівня захисту від УФ-променів. У літературі описано дослідження оксиду цинку як фізичного блокатора та октокрилену як хімічного поглинача в тверді ліпідні наночастинок та отримано потенціал блокування ультрафіолету сонцезахисного продукту [2]. Підготовлені наночастинок показали хорошу стабільність протягом 360 днів із значеннями рН 5,4 – 5,9, які можуть бути буферизовані шкірою. Тест *Transpore™* доводить ефективність розроблених формул щодо потенціалу блокування УФ. Таким чином, ліпідні наночастинок мають потенціал для посилення активності хімічних УФ-фільтрів як сонцезахисних продуктів [5].

Необхідно переглянути потенційну шкоду від епідермального застосування наночастинок у сонцезахисних кремах. Потенційна токсичність частинок визначається поверхневою реактивністю. Таким чином, з огляду на їх структуру, наночастинок будуть виявляють більшу шкоду в порівнянні з більшими частинками через їх пропорційно збільшену площу поверхні [6]. Здатність індукувати утворення вільних радикалів, комплексів з білками та можливість ухилення від імунологічних захисних механізмів є потенційною шкодою нанорозмірних частинок. TiO_2 та ZnO є відомими фотокаталізаторами. Під впливом ультрафіолетового світла вони випромінюють електрони. Ці електрони, в свою чергу, індукують утворення перекиси, вільних радикалів та активних форм кисню. Активні форми кисню, утворені під впливом ультрафіолету TiO_2 та ZnO мають потенціал пошкоджувати білки, ліпіди та ДНК, з якими вони контактують [7]. Вагомість поточних доказів полягає в тому, що наночастинок оксиду титану та оксиду цинку залишаються на поверхні шкіри, зокрема зовнішньому мертвому шарі та не проникають у життєздатні клітини шкіри. Однак побоювання щодо токсичності можуть бути тільки реалізовані, якщо наночастинок TiO_2 та ZnO здатні проникати в епідерміс та дерму [8].

Дослідження проникнення між різними видами повинні виконуватися з обережністю, оскільки проникність може сильно змінюються в залежності від природи виду і досліджуваної сполуки [8]. Хоча певні шкірні захворювання можуть впливати на проникнення місцевих засобів, більшість літератури підтверджує, що шкіра з пошкодженим бар'єром не має більшої схильності до проникнення [9]. При псоріазі наночастинок мають меншу проникність, оскільки епідерміс гіперкератотичний. Через порушення рогового шару, при екземі проникнення матеріалів місцевого застосування було виявлено більше. Усі дослідження про проникнення в шкіру були проведені без контролю впливу ультрафіолету. Тому жодне дослідження ще не моделювало реальний життєвий сценарій застосування сонцезахисних кремів [9].

Діоксид титану класифікується як можливий канцероген для людини Міжнародним агентством з дослідження раку (IARC) через можливість впливу через вдихання. З цієї причини занепокоєння викликають порошкоподібні або

спрейові складі, що містять діоксид титану. Висновки IARC базуються на відкритті, що високі концентрації пігментного (порошкоподібного) та надтонкого пилу діоксиду титану спричиняють рак дихальних шляхів у щурів, які зазнали інгаляцій та інтратрахеальне закапування. Критикується безпека використання наночастинок титану тому що може проникати в організм і досягати внутрішніх органів [10]. Оксид цинку викликає проблеми з інгаляцією, коли використовується в спреях і порошкових продуктах [11].

На сьогоднішній день існує великий вибір сонцезахисних засобів, склад яких включає наночастинок діоксиду титану (TiO_2) та оксиду цинку (ZnO). Австралійський уряд нещодавно підрахував, що 70 % титанових сонцезахисних кремів і 30 % цинкових сонцезахисних кремів були сформульовані з наноінгредієнтів [2]. Загалом, мінеральні сонцезахисні креми, як правило, оцінюються краще, ніж хімічні сонцезахисні креми в базі даних робочої групи з охорони навколишнього середовища – Environmental Working Group (EWG). Однак важливо, щоб виробники використовували форми мінералів, покриті інертними хімічними речовинами, щоб зменшити фотоактивність. Щоб мінімізувати ризики для користувачів сонцезахисних кремів і максимізувати захист цих продуктів від сонця, EWG підтримує жорсткіші рекомендації та обмеження щодо типів цинку та титану, які використовуються в сонцезахисних кремах. Управління з контролю за продуктами і ліками США (FDA) вважає безпечним та ефективним використання наночастинок діоксид титану у складі сонцезахисних кремів. Безпека цинку оксиду і титану діоксиду описана в публікаціях Наукового комітету зі споживчих товарів (Scientific Committee on Consumer Products) [3]. Багаточисельні дослідження показують безпечність та нетоксичність наночастинок діоксиду титану та оксиду цинку, проте відзначено недоліки методів дослідження.

Література

1. Choi M. J. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2005. № 18. P. 209–219. DOI: 10.1159/000086666
2. Berkman M., Yazan Y. Solid lipid nanoparticles: A possible vehicle for zinc oxide and octocrylene. *Pharmazie.* 2012. № 67 (3). P. 202–208.
3. Schreier H. Liposomes and niosomes as topical drug carriers: Dermal and transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 1994. № 30. P. 1–15.
4. Dussert A.S. Characterisation of the mineral content of a physical sunscreen emulsion and its distribution on to human stratum corneum. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1997. № 19. P. 119–129.
5. Australian Government TGA, OTC Medicines Section. A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens. Available from: <http://www.tga.gov.au/npmeds/sunscreen-zotd.pdf>. 2006. Accessed January 16.
6. Donaldson K., Tran C. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol.* 2002. № 14. P. 5–27. DOI: 10.1080/089583701753338613.
7. Yang Y. H., Chen H., Pan G. Particle concentration effect in adsorption/desorption of Zn(II) on anatase type nano TiO_2 . *J Environ Sci (China)*. 2007. № 19. P. 1442–1445. DOI: 10.1016/s1001-0742(07)60235-6.

8. Nohynek G. J., Lademann J., Ribaud C., Roberts M. S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev. Toxicol.* 2007. № 37. P. 251–277. DOI: 10.1080/10408440601177780.

9. Schafer-Korting M., Korting H. C., Ponce-Poschl E. Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris. *Clin Investig* 1994. № 72. P. 1086–1091.

10. Soni M., Taylor S., Greenberg N., Burdock G. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology.* 2002. № 40(10). P. 1335–1373. DOI:10.1016/s0278–6915(02)00107–2.

11. Borm P. J., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol.* 2006. № 3. P. 11.

УДК 578.81:579.66

ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГУ ϕH1JB, ВИДІЛЕНОГО З *LACTOBACILLUS DELBRUECKII*

Ю. О. Хмельницька, О. А. Шидловська

Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Немировича-Данченка, 2, Київ, 01011, Україна

Lactobacillus delbrueckii є однією із найбільш широко використовуваних молочнокислих бактерій в харчовій промисловості для виробництва молочнокислої продукції. Враховуючи економічну значимість, дослідження фагів *L. delbrueckii* мають надзвичайне значення. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SDMCC050201 є одним із комерційних штамів закваски для бродіння йогурту. В даній роботі проведено аналіз властивостей та відомих характеристик профага ϕH1JB виділеного з *L. delbrueckii* SDMCC050201.

У порівнянні з вірулентними фагами, що інфікують *Lactobacillus delbrueckii* під час процесів бродіння молока, інформація про помірні фаги *Lactobacillus delbrueckii* обмежена. Можлива причина полягає в тому, що більшість постачальників стартових культур перевіряють свої штами на наявність профагів. Зазвичай лізогенні штами, що несуть профаг, який легко індукується, не мають виходу до комерційних продуктів. Проте, недостатня точність методів контролю, випадкова контамінація молочної сировини може призвести до втрати готової молочно-кислої продукції.

Виділений з молочнокислої бактерії *L. delbrueckii* бактеріофаг ϕH1JB має ікосаедричний капсид і нескоротливий хвіст. За своєю морфологією ϕH1JB належить до родини *Siphoviridae* за даними Міжнародного комітету з таксономії вірусів. Геном ϕH1JB – лінійна дволанцюгова ДНК, розміром 36 969 bp із загальним вмістом GC 47,7 %. Геном ϕH1JB містить 46 відкриті рамки зчитування (orf), що охоплюють 92,3% усієї довжини геному. 43 з 46 orf орієнтовані в одному напрямку, тоді як orf 12, 13 і 14 розташовані на комплементарному ланцюзі. 89 % початкових кодонів є AUG [2]. У геномі ϕH1JB не виявлено tРНК. Як і багато фагів молочнокислих бактерій, геном



**МІЖНАРОДНА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ
INTERNATIONAL SCIENTIFIC-PRACTICAL CONFERENCE**

**НАУКА, ОСВІТА, ТЕХНОЛОГІЇ І СУСПІЛЬСТВО:
НОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ**

**SCIENCE, EDUCATION, TECHNOLOGY AND SOCIETY:
NEW RESEARCH AND PERSPECTIVES**

**Збірник тез доповідей
Book of abstracts**

**Частина 2
Part 2**



**20 вересня 2022 р.
September 20, 2022**

**м. Полтава, Україна
Poltava, Ukraine**



UDK 604+612.1./8

Rohova M.

Master student

Department of biotechnology, leather and furs,
National University of Technologies and Design,

Kovalenko V.

Master student

Department of biotechnology, leather and furs,
National University of Technologies and Design,

Shkotova L. V.

PhD, Senior Research

Department of Biomolecular Electronics
Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine;

Voloshyna I. M.

PhD, Associate Professor

Department of biotechnology, leather and furs,
National University of Technologies and Design

MAIN PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS FERMENTUM*

Lactobacillus fermentum is Gram-positive facultative anaerobic bacteria of the *Lactobacillaceae* family. Bacteria of this species have high biological and functional activity, which determines their practical use as pharmaceuticals and biologically active food supplements.

Lactobacillus fermentum is used in the industrial food production as an additional culture to enrich the products with probiotic microflora and regulate microbiological processes. In the manufacture of enzymatic cheeses and in industrial baking *L. fermentum* bacteria are used to maintain high organoleptic properties. *L. fermentum* is also used in the making of high-quality silage [1]. Recent studies have shown that *L. fermentum* is able to ferment dietary fiber and release short-chain fatty acids, including propionic, butyric, acetic, and lactic acids, in the intestine. Oral administration of *L. fermentum* can improve glucose metabolism and regulate the generation of innate and adaptive immune cells [1, 2].

L. fermentum has antibacterial effect against many microorganisms, such as *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida*, *Salmonella*, etc. The supernatants of *L. fermentum* culture with low pH are known to have higher bacteriostatic ability against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. This information indicates that the inhibitory activity of this strain correlates significantly with the low pH caused by organic acids [2]. The strains of *L. fermentum* are sensitive to antibiotics such as gentamicin, cefazone, penicillin, trimethoprim, sulfamethoxazole, ampicillin, carbenicillin, but they are resistant to tetracycline and erythromycin [1, 3].

L. fermentum binds to dietary cholesterol and helps to break it down. Because of the assimilation to surface cells and incorporation into the cell membranes, it promotes the removal of cholesterol *in vitro*. There is a direct effect of *L. fermentum* on blood vessels: due to the antioxidant effect, it is used as a remedy for atherosclerosis [3, 4].

L. fermentum has been shown to interact with human immune cells and to modulate specific pathways involved in innate and adaptive immunity in various inflammatory diseases [2]. There are the data about its positive effect on the body immune system and metabolism. *L. fermentum* bacteria synthesize amino acids, enzymes, immunoglobulins, stimulate the phagocytic activity of neutrophils, macrophages, interferons, interleukins and tumor necrosis factor on the immune system. *L. fermentum* bacteria are resistant to lysozyme and produce lysozyme, which in combination with lysozyme of the intestinal mucosa contributes to the resistance of the latter to pathogenic microflora [2, 3]. The function of this species is to model the formation of anti-inflammatory cytokine IL-10 and reduction of the level of inflammatory mediators IL-2, -5, -6, as well as tumor necrosis factor TNF- α [4, 5].

enriched with B vitamins, biotin, PP, folic acid, tocopherol, ascorbic acid. This contributes to the use of these lactobacilli for the prevention and treatment of dysbiosis, infectious diseases, peptic ulcer disease associated with the presence of *Helicobacter pylori*, campylobacteriosis, anaerobic vaginosis, stomatitis, enterovirus infections [2].

L. fermentum is actively involved in metabolic and regulatory processes and is used to develop probiotic preparations and food products. The main properties of *L. fermentum* are its pronounced antagonism against pathogenic microorganisms, the ability to suppress the development of bacteria of other species and strains, resistance to a spectrum of antibacterial agents, and direct participation in maintaining homeostasis in humans and animals.

References

1. Voloshyna I.M., Soloshenko K.I., Krasinko V.O., et al. Bacteriocins *Lactobacillus* – an alternative to antimicrobial drugs. *Biopolymers and Cell*. 2021. № 37(2). P. 85-97. dx.doi.org/10.7124/bc.000A4E.
2. Zhao Y., Hong K., Zhao J., et al. *Lactobacillus fermentum* and its potential immunomodulatory properties. *J. of Functional Foods*. 2019. № 56, P. 21-32. doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.044.
3. Voloshyna I.M., Shkotova L.V., et al. *Lactobacillus* bacteria: biological and therapeutic properties, *Mikrobiol. Z.* 2019. № 81(6), P. 131-146. doi.org/10.15407/mikrobiolj81.06.131.
4. Zhang L., Ma H., Kulyar M.F., Pan H., Li K., Li A., Mo Q., Wang Y., Dong H., Bao Y., Li J. Complete genome analysis of *Lactobacillus fermentum* YLF016 and its probiotic characteristics. *Microb Pathog.* 2022. № 162, P. 105212. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105212.
5. Maldonado J., Cañabate F., Sempere L., Vela F., Sánchez A.R., et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012. № 54 (1). P. 55-61. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182333f18.