

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

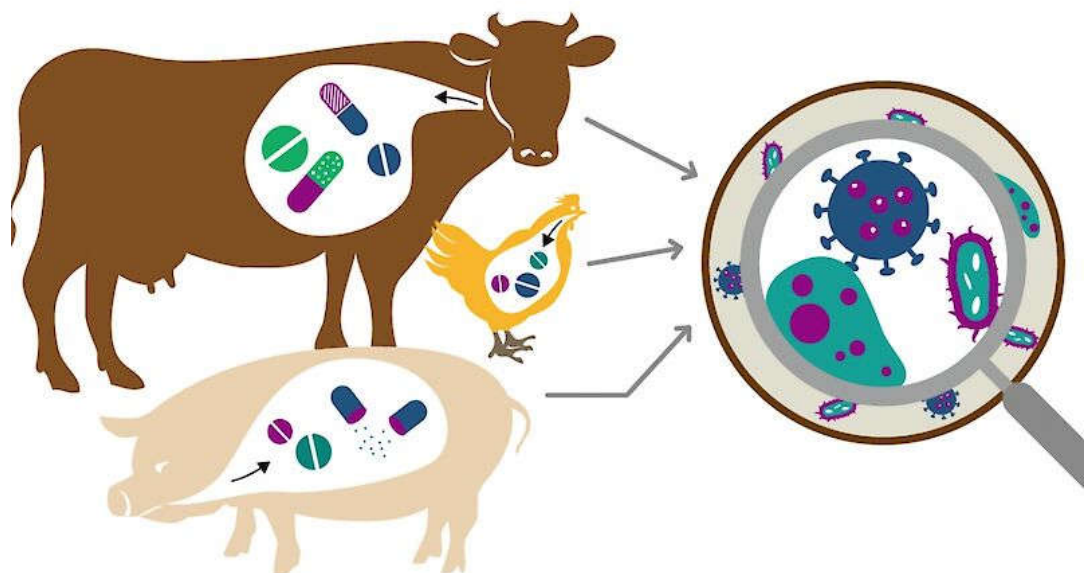
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра біотехнології та біоінженерії

ТЕХНОЛОГІЯ ПРО- ТА ПРЕБІОТИКІВ

Методичні рекомендації

для виконання лабораторно-практичних робіт та
самостійного вивчення дисципліни
для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
ОПП «Біотехнології та біоінженерія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми здобуття вищої освіти



УДК 579.8:60
Т38

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “30” січня 2024 р., протокол № 6.

Укладач:

О. І. Юлевич – доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцентка

Рецензенти:

О. І. Петрова – канд. с.-г. наук, доцент, завідувачка кафедри технології переробки продукції тваринництва та харчових технологій Миколаївського національного аграрного університету

С. П. Кот – канд. біол. наук, доцент, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету

© Миколаївський національний аграрний університет, 2024

ЗМІСТ

ВСТУП		4
1.	Загальні відомості щодо пробіотичних препаратів	6
2.	Види, класифікація та напрями застосування про- та пребіотиків	8
3.	Механізми дії про- та пребіотиків	11
4.	Пробіотики у ветеринарії та годівлі тварин	14
5.	Стадії біотехнологічного виробництва	16
6.	Показники специфічної активності пробіотичних препаратів	19
7.	Особливості культивування мікроорганізмів	22
8.	Товарні форми пробіотичних препаратів та умови їх зберігання	29
9.	Технології моно- та поліштамових пробіотиків	32
10.	Технології створення рекомбінантних пробіотиків	34
11.	Отримання іммобілізованих пробіотиків	38
12.	Виробництво метаболітних пробіотиків	42
Список використаної літератури		44

За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) пробіотики – це «живі мікроорганізми, які при застосуванні в адекватних кількостях викликають покращення здоров'я організму господаря».

Під «пробіотиками» розуміють харчові речовини, що вибірково стимулюють зростання та/або біологічну активність представників нормобіоти кишечника людини. Вони сприяють підтримці нормального складу кишкового мікробіоценозу та біологічної активності окремих її компонентів при споживанні в складі харчової продукції. До найважливіших властивостей пробіотиків відносять непатогенність, стійкість до солей жовчних кислот, низьких рН і протеаз при перевірці *in vitro*, здатність приживатися на слизовій прямій кишці і ефективно блокувати поверхні, які можуть бути зайняті патогенами.

Слово пробіотик походить від латинського *-pro* і грецького *-bio* і буквально означає «для життя». Вперше термін було введено німецьким ученим В.Коллатом у 1953 р. для позначення «активних речовин, необхідних для здорового розвитку життя». У 1965 р. цей термін був використаний Ліллі Д. М. та Стілвеллом Р.в іншому контексті для позначення «речовин, що виділяються одним організмом, які стимулюють зростання іншого». Фуллер Р. у 1992 р. конкретизували визначив пробіотики як «живу мікробну кормову добавку, яка благотворно впливає на тварину-господаря, покращуючи його кишковий мікробний баланс». Активний розвиток технології пробіотиків зажадав узгодженості дій з боку вчених, які пропонують бактеріальні штами у вигляді пробіотиків, технологічних компаній, що впроваджують ці наукові розробки, та організацій, що регулюють їхню діяльність і захищають споживачів від неякісних продуктів. Офіційне визнання пробіотиків та обговорення їхньої значимості для здоров'я людини на рівні міжнародних експертних комісій від імені Продовольчої та сільськогосподарської організації об'єднаних націй (FAO, Food and Agriculture Organization) та ВООЗ відбулося у 2001р. Одним із результатів дискусії стало уточнення та переробка визначення «пробіотик» до наступного: «живі мікроорганізми, які при введенні в адекватних кількостях приносять користь здоров'ю господаря». До теперішнього часу триває активне

обговорення та уточнення термінології, пов'язаної з визначенням пробіотиків та нових варіантів продуктів, що містять живі мікроорганізми та їх метаболіти. Понад те, з розвитком технологій виникають нові терміни. Так, наприклад, пробіотики стали комбінувати з пребіотиками, і з'явився термін «синбіотики». Роль пробіотиків та пробіотичних продуктів для кишечника господаря полягає не тільки в заселенні цінними бактеріями, а й у протидії патогенам, поліпшенні травних процесів, підвищенні імунного захисту.

Лабораторна робота 1

Загальні відомості щодо пробіотичних препаратів

Основні види продуктів мікробного походження:

- Пробіотики – живі мікроорганізми, які при введенні в адекватних кількостях позитивно впливають на стан здоров'я господаря.

- Пребіотики – харчові речовини, що вибірково стимулюють зростання та/або біологічну активність представників нормобіоти кишечника людини. Вони сприяють підтримці нормального складу кишкового мікробіоценозу та біологічної активності окремих її компонентів при споживанні в складі харчової продукції.

- Синбіотики – продукти, що містять як пробіотики, так і пребіотики, які позитивно впливають на стан здоров'я.

- Постбіотики – це функціональні сполуки ферментації, які можна використовувати в поєднанні з нутрієнтами для зміцнення здоров'я. Вони належать до біоактивних сполук, що утворюються внаслідок мікробіологічної ферментації. До постбіотиків належать мікробні клітини, складові клітин і різні метаболіти.

- Молочнокисла бактерія – функціональна класифікація непатогенної, нетоксигенної, грампозитивної, ферментативної бактерії, яка пов'язана з продукцією молочної кислоти із вуглеводів, що робить їх придатними для ферментації їжі. До цієї групи включаються види *Lactobacillus*, *Lactococcus* та *Streptococcus thermophilus*. Багато пробіотиків також входять до групи молочнокислих бактерій, але деякі (такі як певні штами *E. coli*, спороутворюючі та дріжджі, що використовуються як пробіотики) до неї не входять.

- Метабіотики – фізіологічно функціональні харчові інгредієнти, які містять готові активні метаболіти відомих представників природної мікрофлори, що забезпечують посилення впливу на фізіологічні функції та процеси обміну речовин в організмі людини.

Популярність продукції, збагаченої пробіотиками, зростає у всьому світі. За останні роки у світовому масштабі було виведено на ринок величезну кількість пробіотичних продуктів харчування та напоїв.

У Дубліні в січні 2022 року співробітниками відомого американського журналу маркетингових досліджень Research and Markets було складено звіт «Ринок пробіотиків за інгредієнтами, функціями, застосуванням та кінцевим споживачем: глобальний аналіз можливостей та галузевий прогноз на 2021–2030 роки». Автори оцінювали світовий ринок пробіотиків у 34,1 млрд доларів в 2020 р. і прогнозували його збільшення до 2030 р. до 73,9 млрд доларів; при цьому середньорічний темп зростання, за їх оцінками, становитиме 8,6%. За словами дослідників, пандемія COVID-19 справила позитивний вплив на світовий пробіотичний ринок.

Контрольні питання

1. На які групи поділяють мікрофлору товстої кишки?
2. Які продукти харчування володіють пробіотичними властивостями?

3. В чому полягає роль І.І.Мечникова в розробці і впровадженні пробіотиків?
4. Які властивості повинні мати мікроорганізми, що входять до складу пробіотика?
5. За якими видами різняться механізми дії пробіотиків?
6. Вкажіть основні види продуктів мікробного походження.
7. Хто вперше ввів термін «пробіотик»? Як змінювалося з роками трактування цього терміна?
8. 3. Яке походження має термін «пробіотик»?
10. Наведіть сучасне визначення терміна «пробіотик».
11. Які основні види пребіотичних сполук?
12. Що таке синбіотики?
13. Чим різняться синбіотики та симбіотики?
14. У чому полягає відмінність між пробіотиком, функціональним продуктом харчування та біологічно активною добавкою на основі пробіотичних мікроорганізмів?
15. Які вимоги ставляться до пробіотичних штамів мікроорганізмів?
16. Які види мікроорганізмів можна використовувати як пробіотичні?
17. Вкажіть напрями вдосконалення пробіотиків.
18. Охарактеризуйте різні готові форми пробіотиків. Зазначте їхні позитивні та негативні властивості.

Лабораторна робота 2

Види, класифікація та напрями застосування про- та пребіотиків

Нині існує декілька класифікацій пробіотиків. Так, за однією з них, яка заснована на природі складових компонентів препарату, розрізняють такі групи пробіотиків:

- препарати, що містять живі мікроорганізми та структурні компоненти;
- препарати, які містять комплекс живих мікроорганізмів, їхніх структурних компонентів та метаболітів у різноманітних сполученнях;
- препарати на основі живих генноінженерних штамів мікроорганізмів;
- продукти функціонального харчування, які здатні відновлювати мікробну екологію організму-хазяїна.

Згідно з класифікацією, прийнятою в 1996 році, препарати, що нормалізують кишечку мікрофлору, розподіляють на 4 покоління. На фармацевтичному ринку України є кілька поколінь препаратів, які нормалізують мікрофлору кишечника:

Перше покоління – це монокомпонентні препарати, які містять лише один штам бактерій. До них належать “Лактовіт форте”, “Колібактерин”, “Біфідумбактерин”, “Лактобактерин”, “Трилакт”.

Друге покоління – засоби на основі бактерій, які в нормі не проживають в кишечнику, можуть пригнічувати розвиток патогенних мікроорганізмів. До самоелімінірувальних антагоністів зараховують “Біоспорин”, “Ентерол”, “Споробактерин”, “Сімбітер”.

Третє покоління – полікомпонентні препарати, які містять комбінацію декількох штамів бактерій і добавок: “Лінекс”, аналоги “Аципол”, “Біфіліз”, “Ацилакт”, “Біфіформ” тощо.

Четверте покоління – сорбовані біфідовмісні пробіотики, це живі бактерії нормофлори, іммобілізовані на сорбенті – “Пробіфор”, “Біфідумбактерин Форте”, “Флорін Форте”.

Пробіотики також поділяються за родом бактерій, що входять до їхнього складу (табл. 1).

Таблиця 1

Види основних промислових пробіотичних препаратів

	Український виробник	Імпортний виробник
Біфідовмісні	Біфідумбактерин-Біофарма	Біфікол, Біфіліз, Пробіфор, Біфіфор
Колівмісні	Колібактерин-Біофарма	Біофлор, Біфікор
Лактовмісні	Лактобактерин-Біофарма	Лінекс, Лактовіт форте, Біолактон, Ацилакт
Дріжджоподібні грибки, рід бацил, аерококів і сахароміцет	Біоспорин, Субалін	Ентерол, Бактиспорин, Бактисубтил, Ентерожерміна
Ентерококи	–	Лінекс, Біфіфірм

Крім того, препарати для корекції мікробіоценозу можна розподілити на 6 груп.

1. Препарати, що містять монокультури живих мікроорганізмів представників нормальної мікрофлори кишечника.

2. Препарати, що містять комплекс живих мікроорганізмів.

3. Препарати, що містять субстанції, які за орального введення стимулюють ріст і розмноження індигенної флори, насамперед біфідобактерій і лактобактерій.

4. Препарати, що містять монокультури або комплекс мікроорганізмів і субстанцій, що стимулюють їхнє приживлення, ріст і розмноження.

5. Препарати, що містять генноінженерні штами мікроорганізмів з заданими характеристиками.

6. Препарати, які крім мікроорганізмів та продуктів, що стимулюють їхні ріст та розмноження, містять інші сполуки, що впливають на функції клітин органів і тканин людини.

Існує ще один варіант класифікації пробіотичних препаратів для корекції мікробіоценозу:

Монопробіотики – одержані на основі одного штаму пробіотичного мікроорганізму.

Асоційовані пробіотики – містять кілька штамів (2-30).

Гетеропробіотики – пробіотики можуть призначатися широкому колу живих організмів (людині, тваринам, птахам, риbam тощо) незалежно від видової приналежності хазяїна, від якого були виділені штами пробіотичних бактерій.

Гомопробіотики – пробіотики призначають представникам того виду хазяїна, з біоматеріалу якого були виділені відповідні штами.

Аутопробіотики – до складу яких входять штами (аутоштами, аутоасоціації штамів) нормальної мікрофлори, ізольовані від конкретної особи та призначені для корекції її мікроекології (кріобанки).

За механізмом дії препарати пробіотиків є багатофакторними лікувальними засобами. Вони мають антагоністичну активність щодо широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здійснюють коригуючий вплив на біоценоз та стимулюють репаративні процеси.

Контрольні питання

1. Вкажіть, які препарати для нормалізації мікрофлори кишечника існують на фармацевтичному ринку України.
2. Які форми випуску пробіотиків існують?
3. Вкажіть переваги та недоліки сухих препаратів
4. Вкажіть переваги та недоліки рідких препаратів
5. З яких компонентів складаються рідкі форми пробіотиків?
6. Вкажіть вимоги до відбору пробіотичних штамів для промисловості
7. Які особливі характеристики повинні мати пробіотичні штами у клінічному плані?
8. Які особливі характеристики повинні мати пробіотичні штами у технологічному плані?
9. Наведіть визначення:
 - Монопробіотики
 - Асоційовані пробіотики

- Гетеропробіотики
- Гомопробіотики
- Аутопробіотики
- Синбіотики

10. Вкажіть перелік характеристик харчових інгредієнтів, які розглядаються як пребіотики.
11. Як класифікуються пребіотики за хімічною структурою?
12. Вкажіть, на які 3 групи поділяють пребіотики за походженням.
13. Наведіть приклади пребіотиків білкового походження
14. Якими додатковими властивостями володіють олігосахаридні пребіотики?

Лабораторна робота 3

Механізми дії про- та пребіотиків

Позитивний вплив пробіотиків включає або скорочення тривалості дії інфекції, або зниження сприйнятливості до патогенів. Механізми, завдяки яким пробіотичні препарати сприяють досягненню низки фізіологічних ефектів в організмі господаря, дуже різноманітні. Відомо, що пробіотичним препаратам властиві імунологічні та неімунологічні аспекти дії. Пробіотичні препарати впливають на кишкову мікрофлору шляхом стимуляції імунних механізмів слизової оболонки тонкої кишки та активізації неімунних механізмів внаслідок антагонізму/конкуренції з потенційними патогенними мікроорганізмами (табл. 2).

Таблиця 2

Пробіотики	Механізм дії
Імунологічні ефекти	<ul style="list-style-type: none"> • Активація локальних макрофагів для підвищення презентації антигенів В-лімфоцитам та підвищення вироблення секреторного імуноглобуліну А (IgA) місцево та системно • Модулювання цитокінових профілів • Індукує гіпочутливість до харчових антигенів
Неімунологічні ефекти	<ul style="list-style-type: none"> • Перетравлення їжі та конкуренція за поживні речовини з патогенами • Зміна локальної рН для створення не вигідної місцевого довкілля для розвитку патогенів • Виробництво бактеріоцинів для пригнічення патогенів • Усунення супероксидних радикалів • Стимуляція продукції епітеліального муцину • Посилення бар'єрної функції кишківника • Конкуренція із патогенами за адгезію • Модифікація патогенних токсинів
Пребіотики	
<ul style="list-style-type: none"> • Метаболічні ефекти: продукція коротколанцюгових жирних кислот, жировий метаболізм, абсорбція іонів (Ca, Fe, Mg) • Посилення імунітету господаря (продукція IgA, цитокінова модуляція тощо) 	

Імунні механізми позитивного впливу пробіотиків на організм господаря такі: активізують локальні мікрофаги для подальшої презентації антигену В-лімфоцитів, збільшують синтез секреторного імуноглобуліну А, модулюють вміст цитокінів, а також індукують розвиток гіпореактивності до харчових алергенів.

Серед неімунних ефектів найбільше значення мають такі впливи: змінюють місцеве рН, створюючи несприятливі умови для розвитку патогенних мікроорганізмів, продукують бактеріоцини, що інгібують зростання патогенної мікрофлори, видаляють вільні радикали, стимулюють продукцію муцину слизової оболонки кишечника, покращують функціонування інтестинального бар'єру, конкурують за адгезію зі слизом та епітелієм з патогенами та модифікують патогенні бактеріальні ендотоксини.

На сьогодні відомо, що пробіотики мають імуномодулюючу активність. Найбільш вивченою є взаємодія пробіотичних штамів з трансмембранними toll-подібними рецепторами (TLR). Крім того, сигнал від бактерій можуть передавати позаклітинні рецептори лектину типу С (C-type lectin receptors) та внутрішньоклітинні (NOD)-подібні рецептори (NLR).

Через TLR відбувається регуляція кластерів диференціації, таких як CD80, CD83 та CD86. Пробиотики при взаємодії з TLR можуть як посилювати імунну відповідь, так і індукувати режим толерантності, забезпечуючи тим самим протизапальну дію (рис. 1).

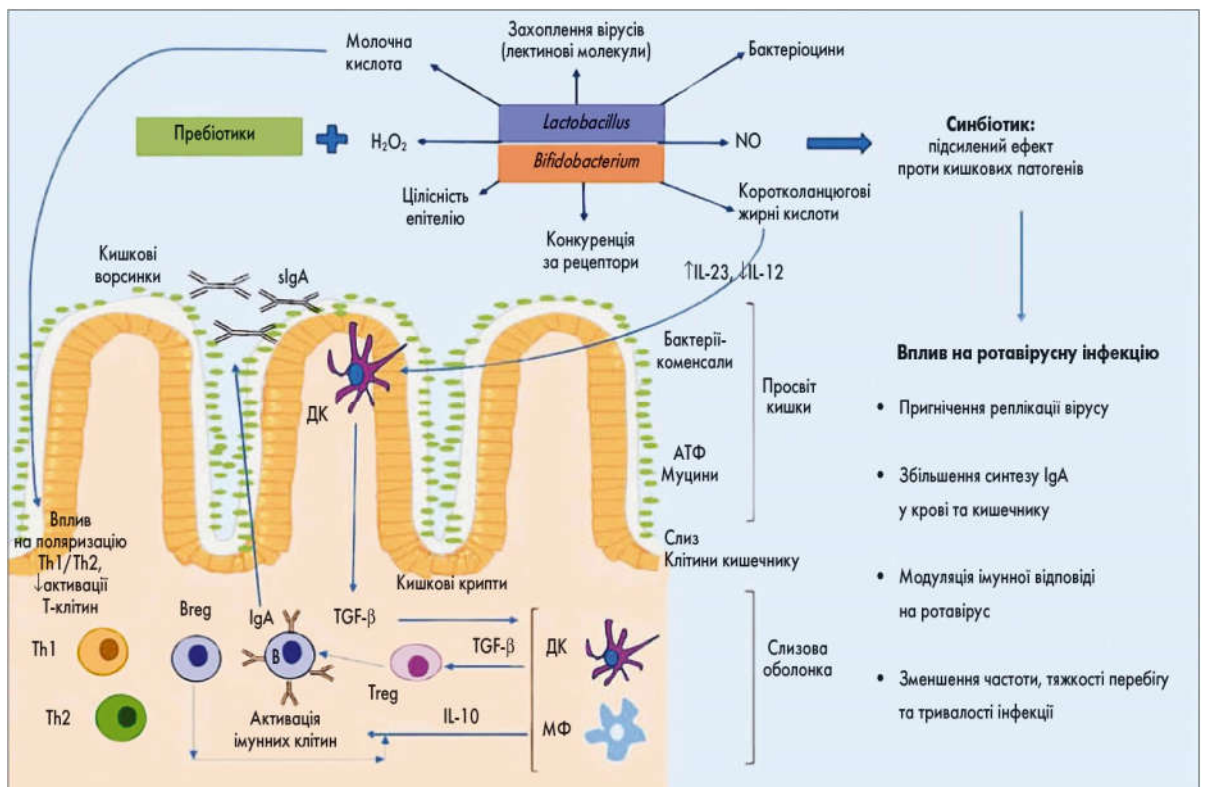


Рис. 1. Механізми дії про- та пребіотиків

Контрольні питання

1. Які існують ефекти впливу пробіотиків на організм господаря?
2. В чому полягає імунологічний вплив пробіотиків на організм господаря?

3. В чому полягає неімунологічний вплив пробіотиків на організм господаря?
4. Якій вплив на організм господаря здійснюють пребіотики?
5. Які ефекти викликає на поверхні клітини адгезія пробіотиків?
6. В чому полягає ефект конкурентного витіснення патогенних мікроорганізмів пробіотиками?
7. В чому полягає значення коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК)? Який вплив здійснює кожна з них?
8. В чому полягає механізм зв'язування і активації протимікробної та прозапальної дії клітин кишкового епітелію?
9. Складіть схему процесів, що відбуваються в кишечнику при надходженні пробіотиків (рис. 1).
10. Складіть схему процесів, що відбуваються в кишечнику при надходженні пребіотиків.

Лабораторна робота 4

Пробіотики у ветеринарії та годівлі тварин

Отримання високих економічних показників і використання в повній мірі генетичного потенціалу сільськогосподарських тварин можливі тільки при повноцінній і збалансованій годівлі, чіткому дотриманні ветеринарно-санітарних заходів і науково обґрунтованих програм щодо застосування профілактичних засобів. Невиконання обов'язкової зооветеринарної технології годівлі та утримання тварин неминуче веде до ослаблення імунітету, зниження загальної резистентності організму.

Хвороби шлунково-кишкового тракту (ШКТ) займають друге місце після вірусних захворювань і є основною причиною загибелі молодняка. Хвороби шлунково-кишкового тракту пов'язані в першу чергу з порушеннями кишкового біоценозу і зниженням резистентності організму, зумовленим ослабленням імунної системи в умовах високої концентрації поголів'я на обмежених територіях, технологічними і кормовими стресами, погіршенням екології, значним хімічним пресингом при застосуванні антибактеріальних препаратів і антибіотикотерапії.

У нормі умовно-патогенні мікроорганізми знаходяться в організмі господаря в невеликій кількості, не викликаючи захворювання, і тільки за певних умов вони стають істинно патогенними. В цьому випадку з хвороботворними мікроорганізмами борються головним чином за допомогою антибіотиків. Однак при тривалому їх використанні у значних дозах, особливо препаратів широкого спектра дії, відбувається селекція резистентної до антибіотиків патогенної і умовно-патогенної мікрофлори. Швидкість пристосування бактерій до антибіотиків набагато перевищує швидкість створення нових препаратів, тому часто антибіотикотерапія неефективна при лікуванні захворювань. Антибіотики пригнічують розвиток нормальної мікрофлори кишечника, що призводить до значного порушення мікробіоценозу в травному тракті, виникнення дисбактеріозів, інших небажаних ефектів.

Стійкість багатьох мікроорганізмів до антибіотиків – добре відома проблема в тваринництві. Вона унеможлиблює лікування цілого ряду інфекційних захворювань. У зв'язку з цим необхідність боротьби з ентеропатогенами без антибіотиків є важливим завданням.

Останніми роками з'явилися нові підходи до лікування дисбактеріозів, що засновані на відновленні природної мікрофлори організму за допомогою біологічно активних продуктів – пробіотиків. Це мікробні препарати, що представляють собою стабілізовані культури мікроорганізмів, які мають антагоністичну активність по відношенню до патогенної мікрофлори. За ефективністю дії пробіотики не поступаються деяким антибіотикам і хіміотерапевтичним засобам. Крім того, вони не оказують згубної дії на мікрофлору травного тракту, не забруднюють продукти тваринництва, а значить, безпечні для людей, які її споживають, не забруднюють навколишнє середовище. Пробіотики не тільки нормалізують якісний і кількісний склад кишкової мікрофлори після застосування антибактеріальних засобів, але в багатьох випадках можуть служити єдиним ефективним методом лікування, профілактики і стимулювання продуктивності тварин.

Як показує практичний досвід, у нинішній час пробіотики набирають все ширшого застосування і можуть бути використані для:

- стимуляції неспецифічного імунітету тварин;
- профілактики і лікування змішаних шлунково-кишкових інфекцій, а також при розладах травлення (дисбактеріози, гострі ацидоза та ін.), що виникають внаслідок різкої зміни складу раціону, порушення режимів годівлі;
- переустановлення мікрофлори травного тракту після лікування антибіотиками або антибактеріальними засобами хіміотерапії;
- заміни антибіотиків у кормах для молодняку тварин і птиці;
- прискорення адаптації тварин до високоенергетичних раціонів;
- підвищення ефективності використання кормів та продуктивності тварин і птиці;
- подолання наслідків технологічних стресів, зумовлених вакцинацією, транспортуванням та іншими діями, що передбачені технологією виробництва.

Завдання

Підготувати презентацію та реферат за темою:

1. Застосування пробіотиків у свинарстві
2. Застосування пробіотиків у птахівництві
3. Застосування пробіотиків у рибництві
4. Застосування пробіотиків у годівлі ВРХ
5. Застосування пробіотиків у підвищенні ефективності аквакультур
6. Застосування пробіотиків у ветеринарії

Лабораторна робота 5

Стадії біотехнологічного виробництва

Необхідною умовою для розроблення технології пробіотиків є збереження їхньої стабільності впродовж тривалого часу. Бактерійні препарати, що містять живі мікроорганізми, найменш стійкі, оскільки їхня активність може знижуватися внаслідок загибелі клітин. Мікроорганізми через низький рівень біологічної організації залишаються життєздатними навіть за умови повного зневоднення. У цьому разі в клітинах лише зворотно уповільнюються або зупиняються обмінні процеси. Для продовження життєздатності бактерій доцільно здійснювати їх сублімаційне сушіння, яке відбувається за низької температури та глибокого вакууму (незначної концентрації кисню).

Сухі біопрепарати гігроскопічні, тому їх закупорюють під вакуумом або в потоці інертного газу.

Факторами, що впливають на виживання мікроорганізмів у препаратах сухих пробіотиків упродовж зберігання, є регламентований вміст залишкової вологи, наявність захисних середовищ, зберігання сухих препаратів у безкисневій атмосфері.

Залежно від технології сучасні пробіотики поділяють на дві групи.

До першої групи належать пробіотики, які виробляють методом ліофільного сушіння суспензії живих активних бактерій. Така форма готового продукту характеризується тривалим терміном придатності та стійкістю до нетривалих змін температури зберігання. Істотним її недоліком є те, що після ліофілізації бактерії перебувають у анабіозі (неактивному стані). Для повернення в активний фізіологічний стан їм потрібно 2-4 год, а за цей час більша частина бактерій виводиться з організму людини. Крім того, в процесі ліофілізації бактеріальні клітини втрачають специфічні рецептори, які забезпечують прикріплення до поверхонь, тому тривалість їхнього перебування у кишечнику істотно знижується.

Другу групу складають рідкі «живі» пробіотики, під час виробництва яких мікробні клітини залишаються в активному стані та здатні до колонізації ПКТ уже через 2 год.

Незважаючи на різноманітність пробіотичних препаратів, їхнє виробництво передбачає два основних блоки робіт: допоміжні роботи і власне технологічний процес.

До допоміжних робіт належать: санітарна підготовка виробництва (підготовка виробничого персоналу, виробничих приміщень, технологічного обладнання і технологічного одягу, приготування мийних, дезінфікувальних та мийно-дезінфікувальних розчинів); підготовка повітря для виробничих приміщень, води фармакопейної якості, сировини і матеріалів (приготування поживних і захисних середовищ, первинного пакування).

Технологічний процес охоплює приготування посівного матеріалу (за потреби одержання культури I-III генерації), виробничий біосинтез, змішування культуральної рідини із захисним середовищем (середовище сушіння), розлив, одержання ліофілізованого напівпродукту (заморожування і сублімаційне сушіння), герметизація напівпродукту, пакування готової продукції, маркування і відвантаження. У деяких випадках мікробна суспензія заморожується і сушиться у низькотемпературних піддонах, після чого подрібнюється і

використовується для подальшого виробництва таких форм пробіотичних препаратів, як капсули, таблетки, супозиторії.

Основні етапи технологічного процесу

Підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез. У процесі виробництва пробіотиків, як й інших продуктів мікробного синтезу, критичним фактором є можлива мінливість виробничих штамів мікроорганізмів унаслідок багаторазових пересівів. З урахуванням цього під час зберігання музейних і робочих культур мікроорганізмів потрібно постійно контролювати стабільність штамів та їхню фізіологічну активність.

Підготовка інокуляту у виробництві пробіотиків передбачає кілька етапів, першим з яких є одержання робочої культури мікроорганізму з музейної. Далі здійснюють кілька послідовних пересівів робочої культури на рідких поживних середовищах. Іноді для вирощування посівного матеріалу використовують різні поживні середовища. У деяких випадках підготовка інокуляту може охоплювати до шести стадій (генерацій культури).

Виробничий біосинтез здійснюють в умовах глибинного періодичного культивування в реакторах, установлених у боксах.

Реактори зазвичай оснащують мішалкою й паровою оболонкою. Основними факторами, що обмежують розвиток мікроорганізмів за таких умов, є вичерпання компонентів поживного середовища та накопичення токсичних продуктів метаболізму. Цьому можна запобігти, здійснюючи дробну подачу субстрату або використовуючи діалізні камери для видалення небажаних метаболітів. Перспективним також є безперервне культивування. Проте нині такий спосіб культивування широко не застосовують у виробництві пробіотиків. Упродовж виробничого біосинтезу періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин (КУО/см³).

Контрольні питання

1. Вкажіть способи, що дозволяють захистити пробіотики від кислого середовища шлунка.
2. Захист від яких зовнішніх факторів може забезпечити використання капсул при виготовленні пробіотичних препаратів?
3. Які переваги має супозиторна форма випуску пробіотиків?
4. В чому полягає різниця між гідрофільною та ліпофільною супозиторною основою?
5. Вкажіть основні етапи технологічного процесу виготовлення пробіотиків. Чому в основному застосовують періодичне культивування при виробництві пробіотиків?
6. Яку роль в процесі виробництва пробіотиків грають захисні середовища?
7. Що таке кріопротектори? В чому полягає їх значення в процесі ліофілізації пробіотиків?
8. Які переваги надає застосування пробіотиків у лінгвальній формі порівняно з звичайною таблетованою формою?

9. В чому полягає перевага мультісимбіотичних пробіотичних препаратів порівняно з полікомпонентними?
10. Вкажіть фактори, що впливають на виживання мікроорганізмів у препаратах сухих пробіотиків упродовж зберігання.
11. Яким чином можна підвищити стійкість мікроорганізмів до сушіння ?
12. Які показники оцінюють під час контролю якості готового пробіотичного препарату?

Лабораторна робота 6

Показники специфічної активності пробіотичних препаратів

Крім обов'язкового для пробіотиків параметра «Кількість життєздатних клітин в одній дозі препарату», існують й інші показники, що визначають терапевтичну дію готової лікарської форми пробіотика. До них належать: активність кислотоутворення; антагоністична, адгезивна, лізоцим-синтезувальна протеолітична активність; антимутагенна і протипухлинна дія; гіпохолестеринемічна активність (здатність знижувати рівень сироваткового холестерину залежно від різних механізмів дії); зниження рівня важких металів; імуномодулювальна активність тощо.

Спектр позитивних властивостей пробіотичних мікроорганізмів та їхньої сприятливої дії на макроорганізм з кожним роком розширюється і відповідно збільшується кількість показників контролю.

Активність кислотоутворення визначають титриметричним методом. Добові культури, наприклад біфідобактерій, центрифугують та за оптичним стандартом мутності готують суспензію 1 млрд кл/см³ у фізіологічному розчині. По 1 см³ такої суспензії вносять у пробірки з 9 см³ середовища Блаурокка (для лактобактерій середовище МРС) та культивують за температури 37°C в анаеробних умовах упродовж 24-48 год. З кожної пробірки відбирають по 5 см³ суспензії та титрують розчином 0,1н гідроксиду натрію за наявності індикатора фенолфталеїну до появи слабо-рожевого кольору. Показник активності кислотоутворення Лактобактерину, виражений у градусах Тернера (°Т), має становити не менш як 200. Кінцевий результат у градусах Тернера визначають за формулою

$$^{\circ}\text{T} = \text{A K} \times 20,$$

де А – об'єм 0,1 н лугу на титрування 5 см³ суспензії, см³;

К – коефіцієнт, що визначається при титруванні 0,1 н розчину лугу 0,1 н бурштиновою кислотою.

Антагоністична активність. Антимікробну дію досліджуваних пробіотичних культур визначають кількома методами, наприклад відстроченого антагонізму, різновидом якого є *метод агарових блоків*.

Штами пробіотичних мікроорганізмів засівають «газоном» у товщі агаризованого середовища МРС. Для цього 1 см³ мікробної суспензії переносять у стерильну чашку Петрі, вносять 15-20 см³ розплавленого агаризованого середовища, охолодженого до температури (45±1)°С, ретельно перемішують і залишають чашки на холодній горизонтальній поверхні до затвердіння середовища.

Вирощування здійснюють в анаеробних умовах за температури 37°C упродовж 72 год, після чого агаровий блок вирізають пробійником та розміщують у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2 (або будь-яким іншим, придатним для вирощування досліджуваних патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів) і радіально підсівають тест-культури. Засіяні чашки інкубують за температури 37°C упродовж 72 год. Ступінь чутливості тест-культур оцінюють за розмірами зон затримки росту, мм: 5-15 – малочутливі; 15-20 – помірно чутливі; 20-30 – чутливі; 30-40 – високочутливі.

Адгезивну активність визначають за допомогою різних методів: мікробіологічних, світлової та електронної мікроскопії, біофізичних і математичних.

Найпростішим є метод дослідження взаємодії мікроорганізмів з небіологічними (абіотичними) матеріалами – вуглеводнями та різними твердими поверхнями. Під час вивчення адгезії слід урахувувати показник гідрофобності клітин – важливий фізико-хімічний параметр, що характеризує співвідношення гідрофобних і гідрофільних компонентів у поверхневих шарах клітинної стінки. Встановлено, що штами лактобактерій з гідрофобною поверхнею адгезують краще, ніж штами з гідрофільною поверхнею.

Лізоцим-синтезувальна активність. Лізоцим визначають методом агарових пластинок. Як субстрат використовують ацетонований порошок індикаторного штаму *Micrococcus luteus var. lysodeicticus* CCM 2665. Тест-культуру вирощують у чашках Петрі на м'ясо-пептонному агарі за температури 37°C упродовж 16 год, змивають 0,9%-м розчином хлориду натрію (3 см³ на чашку), автоклавують 15 хв при 1 атм та зберігають за температури 4°C.

У стерильні чашки вносять по 1 см³ автоклавованої суспензії мікрокока та заливають 12 см³ середовища МРС-1 з додаванням 2% агару (рН 6,0-6,2). Концентрація мікрокока має становити близько 10¹⁰ кл/см³. Дводобові культури лактобактерій (або інших пробіотичних мікроорганізмів) засівають петлею «бляшками» – п'ять штамів на одну чашку з мікрококом, інкубують 4 доби в анаеробних умовах за температури 37°C, після чого реєструють зони лізису мікрокока навколо макроколоній лактобактерій. Про ступінь лізоцимної активності судять за діаметром зони лізису, мм: 1-3 – низька; 4-7 – середня; > 8 – висока. Слід зазначити, що середовище МРС-1 містить 0,2% цитрату амонію та 0,5% ацетату натрію, які здатні активувати лізоцим.

Протеолітичну активність визначають методом, що ґрунтується на визначенні тирозину, утворюваного в результаті гідролізу білка, з реактивом Фоліна. За одиницю протеолітичної активності беруть здатність ферменту каталізувати гідроліз 1 г білка (казеїну) за чітко визначених умов: температура 40°C, рН 10,5, тривалість гідролізу 1 год. Активність позаклітинної лужної протеази при рН 10,5 визначають через 24, 48, 72 та 96 год вирощування мікроорганізмів.

Протеолітичну активність (ПС), од./см³, розраховують за формулою:

$$ПС = \frac{4,7D + 0,1}{m} 1000,$$

де D – оптична густина досліджуваного розчину;

m – об'єм культуральної рідини, см³;

4,7 та 0,1 – сталі коефіцієнти, встановлені експериментально, г/год;

1000 – коефіцієнт для переведення кубічних сантиметрів (см³) у кубічні дециметри (дм³).

Завдання

1. Розглянути різні методи визначення показників специфічної активності пробіотичних штамів

2. Порівняти ефективність застосування різних методів визначення показників специфічної активності пробіотичних штамів.

Особливості культивування мікроорганізмів

Для нормального росту і розвитку мікроорганізмів, як і будь-яким живим істотам, потрібні органічні і неорганічні субстрати, які надають їм енергію та матеріал для біосинтезу. У природних умовах всі необхідні елементи для харчування мікроорганізми отримують з навколишнього середовища. При культивуванні в лабораторних умовах використовують поживні середовища, в яких харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються штучно. Клітини мікроорганізмів потребують для свого розвитку макроелементи (вуглець, азот, водень, кисень, фосфор та ін.) та мікроелементи (цинк, марганець, йод, мідь тощо). Для деяких мікроорганізмів додатково необхідні фактори росту (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти) і вітаміни. Отже, поживні середовища містять збалансований набір органічних та неорганічних речовин і є придатними для росту і розвитку мікроорганізмів (рис. 2).

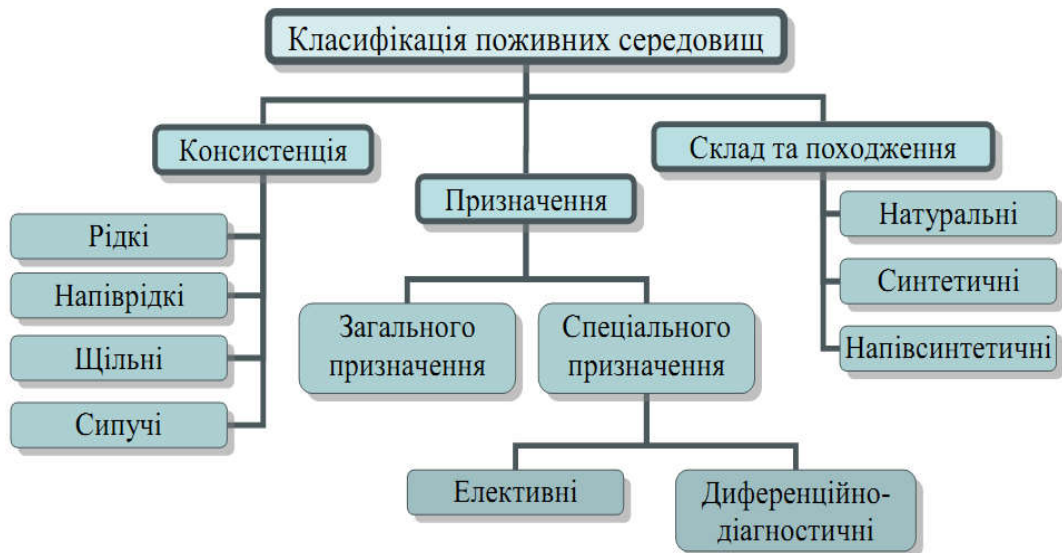


Рис. 2. Класифікація поживних середовищ

Поживні середовища мають відповідати таким вимогам:

- містити всі необхідні джерела макро- та мікроелементів, а за необхідності – вітаміни і фактори росту;
- усі сполуки, які входять до їх складу, мають бути у певному збалансованому співвідношенні;
- містити у своєму складі необхідну кількість води;
- мати оптимальні для мікроорганізмів значення рН;
- бути ізотонічними, тобто мати такий самий осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини;
- бути стерильними.

Приготування поживного середовища Блаурокка.

Для приготування поживного середовища використовують продукт, отриманий шляхом екстракції подрібненої яловичої печінки водою (у співвідношенні 1: 1) з наступним кип'ятінням протягом однієї години і стерилізацією при температурі 120 ± 1 °С протягом 20 хвилин при 0,1 МПа. До екстракту печінки додають пептон (1,0%), натрію хлорид (0,5%), лактозу (1,0%), агар-агар (0,2%), цистеїн (0,01%). Встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації значення рН становило $6,8 \pm 0,3$; кип'ятять, фільтрують і стерилізують при 112 ± 1 °С 30 хвилин (0,05 МПа). Середовище зберігають при температурі 6 ± 2 °С не більше 2-х місяців. На флакони наклеюють етикетки, де вказано: найменування середовища, кількість і дата приготування. Поживне середовище можна зберігати при температурі 2-8 °С протягом 60 діб.

2. Приготування казеїново-дріжджового поживного середовища.

Вибір казеїново-дріжджового середовища насамперед пов'язаний з тим, що це середовище значною мірою відповідає вимогам масового виробництва за сукупністю біологічних, технологічних і економічних параметрів. Для виготовлення казеїново-дріжджового середовища необхідні ферментативний гідролізат казеїну та автолізат пекарських дріжджів. Гідролізат казеїну отримують шляхом проведення ферментативного гідролізу казеїну підшлунковою залозою при рН 8,0–8,2 і температурі 58–62 °С протягом 5–7 діб (на 200 г казеїну використовують 1,0 л води і 200 г подрібненої свинної підшлункової залози). Протягом усього зазначеного терміну значення рН підтримується на вказаному рівні. Починаючи з 4-го дня, проводять визначення амінного азоту. Припинення його зростання свідчить про те, що процес гідролізу закінчено. Вміст амінного азоту в гідролізаті казеїну має бути від 450 до 600 мг%. Прозору надосадну рідину відділяють і піддають фільтрації. Гідролізат казеїну піддають стерилізації при температурі 120 ± 1 °С протягом 30 хвилин і тиску 0,11 МПа. Зберігають гідролізат при температурі 2–10 °С.

Приготування автолізата пекарських дріжджів проводять шляхом лізування дріжджових клітин при температурі 56–58 °С протягом 48 годин. До дріжджів додають воду (у співвідношенні 1: 4) і суміш стерилізують при температурі 119–121 °С і тиску 0,11 МПа протягом 30 хвилин. Вміст амінного азоту в автолізаті – 150-180 мг%. Зберігають при температурі 4–10 °С не більше 1,5 місяця.

Приготування казеїново-дріжджового середовища: ферментативний гідролізат казеїну, розведений водою до вмісту амінного азоту 150 ± 10 мг% змішують з дріжджовим автолізатом (співвідношення 1: 2), додають натрію хлорид (0,5%), встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації значення рН становило $7,0 \pm 0,2$, кип'ятять, додають лактозу, агар-агар та цистеїн. Суміш фільтрують і стерилізують при температурі 119–121 °С і тиску 0,11 МПа протягом 30 хвилин.

На флакони наклеюють етикетки, де вказано: найменування середовища, кількість і дата приготування. Поживне середовище можливо зберігати при температурі 2–8 °С протягом 7 діб.

3. Приготування середовища МРС-4.

Марганцю сульфат (50 мг), магнію сульфат (200 мг), L-цистеїн (200 мг), калій фосфорнокислий (2 г), амонію цитрат (2 г), натрію ацетат (5 г), глюкозу (20 г) розчиняють при нагріванні в 200 мл води, додають пептон сухий (10 г), Твін-80 (1 мл), дріжджовий автолізат (150 г), печінкової води (100 мл), агар-агар (20 г), воду до об'єму 500 мл, гідролізоване молоко (500 мл). В отриманій суміші встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації в готовому середовищі значення рН становило $6,4 \pm 0,2$, кип'ятять протягом 1 хвилини, розливають у флакони по 100 мл і стерилізують при температурі 112 ± 1 °С 30 хвилин.

На флакони наклеюють етикетки, де вказано: найменування середовища, кількість і дата приготування. Поживне середовище можливо зберігати при температурі 2–8 °С протягом 30 діб.

Стерилізація

Мета процесу стерилізації полягає в повному знищенні всіх живих мікроорганізмів і спор у середині або на поверхні об'єкта. Стерилізують поживні середовища, лабораторний посуд, інструменти, розчини і т.д.

Стерилізація (від латин. *sterilis* – безплідний, тобто «стерилізація» – знепліднення) – це знищення мікроорганізмів у різних об'єктах шляхом дії на них чинниками, згубними для мікроорганізмів. Всі засоби стерилізації розділяють на фізичні та хімічні; або на термічні та холодні. Вибір відповідного засобу залежить від властивостей об'єкту стерилізації.

Термічна стерилізація базується на знищенні мікроорганізмів за допомогою високих температур. Термічна стерилізація легко здійснюється і найчастіше використовується в практичній діяльності людини та мікробіологічній практиці. При цьому потрібно пам'ятати, що у вегетативних (неспорових) клітинах денатурація білків і загибель починається вже при температурі 56-60°C. Більш термостійкі спори гинуть у сухій атмосфері при температурі 160 °С протягом 1-2 год, а у вологому середовищі загибель спор відбувається при температурі 112-120°C протягом 20-30 хв.

Низькі температури не вбивають, а лише затримують розвиток мікроорганізмів. *Холодні методи стерилізації* включають різноманітні методи знищення мікроорганізмів. Називають їх холодними умовно, щоб підкреслити, що вони не пов'язані з дією високих температур. До цих засобів відносять хімічну стерилізацію або дезінфекцію, різні фізичні методи стерилізації (окрім використання температурного фактору) та механічне звільнення від мікроорганізмів (стерилізуюча фільтрація).

До методів термічної стерилізації належать: 1) кип'ятіння, 2) стерилізація сухим жаром, 3) стерилізація текучою парою, 4) стерилізація парою під тиском, 5) пастеризація, 6) дробна стерилізація та тиндалізація.

Кип'ятіння є одним з найпростіших способів стерилізації. Проводиться у стерилізаторі – металевій прямокутній коробці з кришкою і сіткою на дні для розташування предметів, що стерилізуються. У нього наливають воду та нагрівають до кипіння. Кип'ятіння триває від 15-30 хв до 2 год при температурі близько 100°C. Кип'ятінням стерилізують дрібні металеві або скляні предмети – шприци, голки, скляні трубки та ін. При цьому гинуть вегетативні форми мікроорганізмів і частина спор. Кип'ятінням у дистилаті стерилізують мембранні

фільтри. Режим стерилізації для мембранних фільтрів – 30-60 хв. з моменту енергійного закипання води. У мікробіологічній практиці таким способом стерилізації користуються рідко у зв'язку з тим, що тривале кип'ятіння може пошкодити оброблюваний матеріал, а скорочення часу кип'ятіння може не забезпечити стерильності.

Стерилізація сухим жаром. Проводиться гарячим повітрям у печі Пастера або сушильній шафі. Стерилізація проводиться при температурі 160-170°C протягом 1,5-2 год. Стерилізують сухим жаром переважно скляний посуд – чашки Петрі, піпетки, шпатели, пробірки, колби. Цей метод надійний – гинуть спорові і неспорові форми мікроорганізмів. Обернутий у папір простерилізований посуд можна зберігати.

Стерилізація текучою парою. Проводиться гарячим вологим повітрям в апараті Коха. У нижню частину металевого циліндру наливають воду, над нею розташовують полицю з отворами і матеріал, що стерилізується. Апарат щільно закривають конічною кришкою з отвором для виходу пари і нагрівають на вогні. Коли вода закипить, гаряча водяна пара з температурою близько 100°C «потече» сильним струменем з отвору кришки. З цієї миті відраховують час початка стерилізації. Стерилізація текучою парою триває від 45 хв до 1,5 год залежно від об'єму матеріалу, що стерилізується. В такий спосіб стерилізують поживні середовища, які не можна нагрівати вище 100 °С, наприклад м'ясо-пептонний желатин (при температурі вище 100°C він розріджується та не застигає). Цей засіб стерилізації не достатньо надійний – повністю гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори зберігаються. Для досягнення повної стерилізації середовища в апараті Коха застосовують дробну стерилізацію.

Стерилізація парою під тиском. Проводиться насиченою водяною парою в автоклаві. Автоклави бувають різної конструкції, але засновані на одному принципі. Це металева двостінна ємність, здатна витримувати високий тиск. Внутрішня частина – стерилізаційна камера, в яку поміщають матеріал, що стерилізується. Вона оточена водопаровою камерою, яка має кран для виходу повітря і пари. При стерилізації у водопарову камеру наливають воду до необхідного рівня. Предмети у камері слід розміщувати не дуже щільно, оскільки пара повинна вільно проходити між ними. Кришка автоклава герметично закривається. Після закінчення часу стерилізації нагрівання припиняють, відкривають паровий клапан і спускають пару.

Стерилізують парою під тиском поживні середовища, скляний посуд, інструменти й ін.

Автоклавування є швидким і надійним способом стерилізації, при якому гинуть всі форми мікроорганізмів, навіть найстійкіші спори.

Пастеризація. Цей спосіб часткової стерилізації названий на честь французького вченого Л. Пастера. Він полягає в тому, що рідину, налиту в стерильний посуд, прогрівують на водяній бані при температурі 60–90 °С протягом 10-30 хв. Застосовують пастеризацію для середовищ, які змінюють свої фізико-хімічні властивості при високих температурах. Пастеризовані продукти тривалому зберіганню не підлягають, оскільки при цьому методі стерилізації гинуть лише вегетативні форми мікроорганізмів, а спори залишаються. У

лабораторній практиці в такий спосіб відокремлюють види мікроорганізмів, що утворюють спори від тих, що не утворюють. У лабораторних умовах пастеризацію проводять або на водяній бані, або в термостаті при наступних режимах: 60-70°C протягом 30 хв; 80°C протягом 10-15 хв.

Дробна стерилізація, або тиндалізація використовується для стерилізації поживних середовищ і розчинів, які псуються при використанні температур вище 100°C. Матеріал стерилізується в декілька прийомів. Дробним може бути кип'ятіння або стерилізація текучою парою в апараті Коха. Метод розроблений Дж.Тиндалем. Матеріал стерилізують при $100\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 10 хв. За цей час усі вегетативні клітини гинуть, життєздатними залишаються тільки спори. Потім рідину охолоджують до температури, оптимальної для проростання спор (30°C), і через декілька годин знову пропускають пару. Двох-трьох подібних циклів зазвичай буває достатньо для знищення всіх спор. Тиндалізацію зазвичай проводять 3 дні по 30 хв щодня, а в перервах залишають матеріал при кімнатній температурі. Це робиться для провокування зростання спор у вегетативні форми і їх знищення при подальших обробках, що підвищує надійність цих засобів.

Інший різновид дробної стерилізації – дробна пастеризація – проводиться у водяній бані при температурі 56-58 °C протягом 1 год з 5-6-кратним повторенням через 24 год. В інтервалах між прогріваннями матеріал витримується при кімнатній температурі. Так стерилізують поживні середовища бідні мікроорганізмами, а також середовища, що містять речовини, які легко руйнуються і денатурують при температурі вище 60°C (білки, вітаміни).

При холодній стерилізації використовують хімічні речовини або діють на об'єкт чинниками фізичної природи.

Хімічні методи припинення життєдіяльності мікроорганізмів базуються на використанні дезінфектантів і антисептиків, що мають неспецифічний ефект, або використанні антибіотиків і синтетичних антимікробних препаратів з вибірковою протимікробною дією. Загибель мікроорганізмів при дезінфекції відбувається здебільшого в результаті гідролізу компонентів клітин, коагуляції білків, інактивації клітинних ферментів. Метод хімічної стерилізації застосовують при дезінфекції рук, робочого столу, відпрацьованих скелець і т. д. До антисептиків або дезінфікуючих засобів належать мило, деякі органічні барвники, солі важких металів, окисники (хлор, йод, перекис водню, перманганат калію), формалін, спирти (60-70 %-кові водні розчини), кислоти, антибіотики, газоподібні речовини (формальдегід, окис етилену, озон) і ін. Стійкість мікроорганізмів до їх дії може суттєво змінюватися залежно від таких факторів як концентрація активного компоненту, тривалість контакту, рН, температура, вологість.

Фізичні методи стерилізації: стерилізація ультрафіолетовими променями, радіоактивним випромінюванням, ультразвуком, струмом ультрависокої частоти і ін. Ці методи широко використовують в медицині. Стерилізація з використанням опромінення придатна для термолабільних матеріалів.

Ультрафіолетові промені використовуються для стерилізації центрифужних пробірок, наконечників для піпеток та ін. виробів з термолабільної пластмаси. Час опромінення визначається потужністю лампи,

часом дії, кількістю і видовим складом мікроорганізмів забрудненого матеріалу. Вегетативні форми чутливіші до опромінення, ніж спори, які в 3-10 разів більш стійкіші. Від УФ-випромінювання мікроорганізми можуть бути захищені органічними речовинами, пилом або іншими захисними оболонками. Обмеженням при використанні даного методу стерилізації є низька проникна здатність УФ-променів і висока поглинальна здатність води і скла. Для знезараження повітря використовують бактерицидні лампи. Зважаючи на можливу несприятливу дію ультрафіолетових променів на організм людини бактерицидні лампи включають лише за відсутності людей у приміщенні.

Рентгенівське і γ -опромінювання також ефективно для стерилізації пластмас, харчових продуктів, але вимагає суворого дотримання правил безпеки.

Найбільш чутливі до γ -опромінення вегетативні клітини бактерій, потім йдуть цвілеві гриби, дріжджі, бактерійні спори і віруси. γ -Опромінення використовується для стерилізації лікарняного приладдя, антибіотиків, вітамінів, гормонів, стероїдів, пластмасового разового устаткування, шовного і перев'язувального матеріалу.

Механічний метод стерилізації, або стерилізація фільтруванням застосовується в тих випадках, коли субстрати не витримують нагрівання і дії хімічних речовин (білки, сироватки, антибіотики, вітаміни, леткі речовини і ін.). Метод полягає у пропусканні рідин і газів через спеціальні дрібнопористі фільтри (бактерійні), діаметр пор яких не перевищує 0,45–0,2 мкм. Фільтри затримують мікроорганізми.

Для пропускання розчину через фільтр потрібний вакуум або тиск. Існують два основні типи фільтрів – глибинні і мембранні. Глибинні складаються з волокнистих або гранульованих матеріалів, які спресовані, звиті або зв'язані в лабіринт проточних каналів. Частки затримуються в них у результаті адсорбції і механічного захоплення в матриксі фільтра. Мембранні фільтри мають безперервну структуру і захоплення ними часток визначається розміром пір.

Контрольні питання:

1. Вкажіть основні типи та склад поживних середовищ для культивування різних типів клітин.
2. Вкажіть основні поживні потреби клітин.
3. В чому полягають переваги та недоліки різних типів поживних середовищ?
4. Вкажіть особливості приготування різних видів середовищ.
5. Порівняйте тривалість зберігання різних типів середовищ, пояснить з чим пов'язані особливості їх зберігання
6. Опишіть основні методи стерилізації (сухий жар, автоклавування, випромінювання, хімічну обробку та фільтрацію): умови, матеріали та обмеження.
7. Вкажіть причини за яких вибирають той чи інший метод стерилізації об'єкту.
8. Якими є правила упаковки скляного посуду при стерилізації?

Лабораторна робота 8

Товарні форми пробіотичних препаратів та умови їх зберігання

Сучасні лікарські форми пробіотиків. Нині пробіотики випускають у таких формах:

- ліофільно висушена біомаса у флаконах або ампулах;
- ліофільно висушена біомаса у желатинових капсулах;
- супозиторії ректальні та вагінальні з ліофільно висушеної біомаси;

- ліофільно висушена біомаса, пресована в таблетки, вкриті розчинною у кишечнику оболонкою;
- лінгвальні таблетки, що розсмоктуються під язиком.

Необхідною умовою під час розробки технології і виробництва пробіотиків є збереження їх стабільності впродовж тривалого часу. Бактерійні препарати, що містять живі мікроорганізми, є найменш стійкими, оскільки їх активність може знижуватися внаслідок загибелі клітин. Мікроорганізми через низький рівень біологічної організації залишаються життєздатними навіть за умови повного обезводнення, у цьому разі в клітинах лише зворотно уповільнюються або зупиняються обмінні процеси. Для подовження життєздатності бактерій доцільно здійснювати їх сублимаційне висушування, яке відбувається за низької температури та глибокого вакууму (незначної концентрації кисню). Через гігроскопічність закупорювання сухих біопрепаратів здійснюють під вакуумом або в течії інертного газу.

Факторами, що впливають на виживання мікроорганізмів у препаратах сухих пробіотиків упродовж зберігання, є регламентований вміст залишкової вологи, наявність захисних середовищ, зберігання сухих препаратів у безкисневій атмосфері.

З метою захисту пробіотиків від кислого середовища шлунку на таблетовані й капсульовані форми наносять ацидорезистентні покриття або здійснюють іммобілізацію бактерій на сорбенті.

Нетрадиційною, проте ефективною у деяких клінічних випадках, лікарською формою пробіотиків є кисломолочний продукт, який утворюється під час заквашування молока пробіотичним штамом. Таку форму пробіотиків можна розглядати як нову прогресивну генерацію функціональних продуктів харчування.

Більшість пробіотиків випускають у ліофілізованій формі (порошки, таблетки, капсули, супозиторії). Суха форма характеризується високим терміном зберігання, зручністю транспортування та зберігання, не потребує суворого дотримання температурного режиму. Проте такі пробіотики характеризуються тривалим виходом мікробних клітин зі стану анабіозу (2-4 год за оптимальних умов культивування, які можна забезпечити лише в лабораторіях).

В умовах ШКТ за цей проміжок часу більша частина пробіотичних клітин може елімінуватися, не встигнувши активізуватися. Тому виробництво пробіотиків у сухій формі більше пов'язане з комерційним інтересом фірм виробників, ніж із забезпеченням високої якості препаратів. В організмі людини значна частина ліофілізованої мікрофлори (близько 70%) гине в агресивних умовах ШКТ ще до реактивації.

Технологічні способи, які полягають у введенні до складу препарату пребіотиків з метою стимуляції пробіотичної флори, не завжди можуть змінити ситуацію. По-перше, кількість пребіотика, яку можна ввести до складу дози препарату, є надто незначною для прояву помітного ефекту. По-друге, під час транзиту через біотопи проксимальної ділянки ШКТ пребіотик здебільшого метаболізується.

Використання кислотостійких капсул не вирішує проблеми підвищення ефективності пероральних пробіотиків, оскільки висока кислотність ШКТ є лише однією з багатьох перешкод. Причому значущість цієї перешкоди нівелюється, якщо пероральний пробіотик приймається з їжею, яка є потужним фактором захисту мікрофлори від шлункового соку.

Нині заслуговують на увагу та дедалі ширше використовуються ректальні пробіотики.

Контрольні питання

1. Яким чином реактивують пробіотики, що містять суху ліофілізовану біомасу, порівняно з пробіотиками на основі рідкої культури?
3. Які методи збереження допомагають подовжити життєздатність бактерій у препаратах сухих пробіотиків, і які фактори впливають на їх виживання протягом зберігання?
4. Які методи використовуються для пробіотиків у таблетованих і капсульованих формах для захисту їх від впливу кислого середовища шлунку?
5. Які технологічні виклики пов'язані з виробництвом пробіотиків у сухій формі, і як це впливає на їх ефективність при прийомі організмом?
6. У чому полягає перевага кисломолочних продуктів як лікарської форми пробіотиків, порівняно з традиційними ліофілізованими формами?
7. Які основні товарні форми пробіотичних препаратів існують?
8. Які фактори можуть призводити до зниження активності пробіотиків під час зберігання?
9. Які фактори є найбільш важливими для забезпечення довготривалої активності пробіотиків?
10. Як змінюється стабільність пробіотиків залежно від їхньої товарної форми?
11. Що таке лінгвальні пробіотики і як вони відрізняються від звичайних пробіотиків?
12. Як контролюється якість та чистота складових під час виробництва таблеток пробіотиків?
13. Які можливі переваги або недоліки можуть бути пов'язані з вибором пробіотиків конкретної національності?
14. Які типи мікроорганізмів найчастіше використовуються в препаратах пробіотичного ряду різних поколінь?
15. Як впливає покоління препарату пробіотиків на його ефективність та безпеку?
16. Які можливі ризики пов'язані з використанням старіших пробіотичних препаратів порівняно з новітніми?
17. Які основні методи іммобілізації пробіотиків використовуються у виробництві?
18. Які можливі ризики пов'язані з використанням рекомбінантних пробіотиків?
19. Як взаємодіють різні мікроорганізми у складі полікомпонентних пробіотиків і як це впливає на ефективність та стабільність?

20. Які основні характеристики відрізняють мультипробіотики від інших форм пробіотиків?

21. Як можна оцінити безпеку мультипробіотиків у порівнянні з іншими формами пробіотиків?

Завдання

Заповніть таблицю щодо характеристики різних типів сучасних форм пробіотиків.

Тип лікарської форми	Основні характеристики	Вимоги до зберігання	Переваги	Недоліки	Рекомендації щодо застосування
Ліофільно висушена біомаса у флаконах або ампулах					
Ліофільно висушена біомаса у желатинових капсулах					
Супозиторії ректальні та вагінальні з ліофільно висушеної біомаси					
Ліофільно висушена біомаса, пресована в таблетки, вкриті розчинною у кишечнику оболонкою					
Лінгвальні таблетки, що розсмоктуються під язиком					
Кисломолочний продукт					

Лабораторна робота 9

Технології моно- та поліштамових пробіотиків

Моноштамові пробіотики, або монопробіотики, – це пробіотики на основі одного штаму пробіотичного мікроорганізму. Такі пробіотики були першими бактеріотерапевтичними препаратами для відновлення нормальної мікрофлори. До цієї групи препаратів належать так звані класичні пробіотики – Лактобактерин, Біфідобактерин і Колібактерин. Крім них, сьогодні на ринку

України зареєстровано значну кількість моноштамових пробіотиків як виробництва України, так й інших країн.

Пробіотики на основі лактобактерій випускають як фармакопейні препарати у різних лікарських формах – таблетки, ампули, свічки, які містять ліофілізовані бактерії (Лактобактерин, Ацилакт, Ацитол), а також у вигляді біологічно активних харчових добавок (сухі чи рідкі закваски ацидофільних лактобактерій на зразок Наріне) та різних функціональних продуктів харчування (ферментоване молоко, морозиво, фруктові, овочеві соки тощо).

Український ринок пробіотиків II покоління

До 2-4-штамових пробіотиків належать препарати, що містять від двох до чотирьох штамів бактерій одного й того самого виду та роду або представників різних видів і родів.

Типовим представником цієї групи пробіотиків є вітчизняний препарат Біфікол, що складається з двох пробіотичних мікроорганізмів, які належать до різних родів (*Bifidobacterium* і *Escherichia*): *B. bifidum* 1 та *E. coli* M-17 (для одержання моно-штамових пробіотиків використовують відповідно Біфідобактерин і Колібактерин).

На фармацевтичному ринку України група 2-4-штамових пробіотиків представлена бактеріотерапевтичними препаратами, наведеними нижче.

Біоспорин (Україна), Біфідофілус Флора Форс (США), Вагілак (Канада), Йогурт (Канада), Лацидофіл® (Канада), Окарин (Україна), Біфолак™ – ліофільно висушена маса живих молочнокислих бактерій (*L. acidophilus* Probio-Тес LA-15 і *B. bifidum* Probio-Тес BB-12), Омніфлора –ліофільно висушена біомаса у твердих желатинових капсулах. Препарат відомий у двох варіантах: трикомпонентний містить штами *E. соїі*, *B. longum*, *L. acidophilus*', варіант Омніфлора-Н – *B. longum* та *L. gasseri* (Німеччина), Примадофілус – препарат випускають у чотирьох варіантах для будь-якого віку. Містить штами високоімплантованих мікроорганізмів: *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *B. infantis*.

Загальна характеристика полікомпонентних пробіотиків

Підвищення ефективності пробіотикотерапії передбачає використання для створення пробіотиків штамів, стійких як до «технологічних» стресів, неминучих під час виробництва препарату, так і здатних проявляти пробіотичні властивості в ентєральних умовах пацієнта. Широко використовувані моноштамові пробіотики часто виявляються недостатньо ефективними, оскільки практично не можна виділити *ex situ* штам, який би задовольняв усі вимоги, що ставляться до таких біопрепаратів. Аналіз природних біоценозів людини свідчить про їхню полікомпонентність, а отже, логічним і закономірним видається висновок про необхідність конструювання полікомпонентних пробіотиків.

Полікомпонентні пробіотики (поліштамові, полікомпонентні, мультипробіотики) – це препарати, у складі яких міститься більш ніж чотири пробіотичних штами мікроорганізмів, їх можна одержувати простим змішуванням ліофільно висушеної біомаси кількох штамів, кожен з яких вирощується окремо (перший спосіб), або симбіотичною композицією штамів,

сформованою на стадії виробничого біосинтезу (другий спосіб). Ураховуючи, що в лабораторних умовах (на відміну від природних екосистем) стабільного симбіозу навіть кількох пробіотичних штамів досягти досить важко через неминуче формування конкурентних відносин між ними, більшість полікомпонентних пробіотиків виробляють за першим способом. Неefективність цього способу очевидна, оскільки після введення такої мікробної суміші в організм людини пробіотичні мікроорганізми також можуть конкурувати між собою, що призведе до зниження активності препарату.

Завдання

1. Скласти загальну схему, за якою одержують Лактобактерин
2. Скласти загальну схему, за якою одержують Симбітер

Лабораторна робота 10

Технологія створення рекомбінантних пробіотиків

З розвитком молекулярної біології з'явилася можливість створення пробіотиків на основі мікроорганізмів з новою генетичною програмою перенесенням генетичної інформації з одного організму в інший. Перспективним є створення генно-інженерних препаратів-пробіотиків з використанням живих бактеріальних векторів для доставки гетерологічних імуногенних епітопів, що

поєднується з доставкою цитокінів, які активують місцевий імунітет. Нині нараховуються десятки рекомбінантних штамів мікроорганізмів, які несуть гени, відповідальні за синтез α , β і γ -інтерферонів, різного типу інтерлейкінів, фактора некрозу пухлин тощо.

Лікувально-профілактичні пробіотики на основі бактеріальних векторів характеризуються простотою виготовлення, оскільки не потребують високоякісного очищення лікарської речовини. Створення таких препаратів полягає в отриманні біомаси мікроорганізмів з наступною її сублімацією, а це, в свою чергу, забезпечує простоту їхнього зберігання. Пероральний прийом пробіотиків також є найпростішим і найбезпечнішим способом введення рекомбінантних препаратів.

Сучасні методи модифікації геному пробіотиків. Використання генної інженерії для створення пробіотичних мікроорганізмів з заданими властивостями здійснюється шляхом маніпуляцій з їх власним ДНК та з ДНК інших мікроорганізмів, що також мають статус GRAS (Generally recognized as safe, «загально визнано безпечно») за допомогою таких методів: індукованого мутагенезу (random mutagenesis); використанням векторів, отриманих з криптичних плазмід МКБ/LAB або біфідобактерій; інтеграції генів-мішеней у пробіотичний штам шляхом сайт-специфічної рекомбінації; використанням системи CRISPR-Cas.

Індукований мутагенез (random mutagenesis). Для отримання мутантних МКБ/LAB з заданими функціями можливе використання індукованого мутагенезу фізичними (опромінення) або хімічними мутагенними агентами. Відзначається що деякі види МКБ/LAB мають стійкість до ультрафіолету більша ніж у *E. coli* і не здатні створювати мутантні варіанти з підвищеним синтезом потрібних досліднику речовин. Хімічний мутагенез може підвищувати рівень продукування багатьох продуктів, наприклад, молочної кислоти, або рибофлавіну. Однак індукований мутагенез не є контрольованим і в багатьох випадках призводить до індукції небажаних мутацій та тривалого відбору штамів. На сьогодні ці методи є застарілими і майже не використовуються.

Використання криптичних плазмід для створення рекомбінантних пробіотиків. Вектори харчової якості (food-grade vectors) були розроблені для задоволення промислових потреб у рекомбінантних продуктах. Вектори конструюються з використанням ДНК GRAS-мікроорганізмів.

Головна вимога до таких векторів – відсутність маркерів стійкості до антибіотиків. Можна сказати, що саме МКБ/LAB були першими мікроорганізмами, які було модифіковано такими векторами. Назва цих векторів – криптична плазміда – позахромосомний елемент ДНК у вигляді замкненої в кільце дволанцюгової молекули ДНК.

МКБ/LAB мають велику кількість криптичних плазмід, які мають малий розмір та можуть демонструвати високу стійкість до маніпуляцій *in vitro*. Окрім цього вони містять гени, що необхідні для реплікації та мобілізації плазмід та не мають явного впливу на фенотип господаря. На сьогодні виділено багато критичних плазмід МКБ/LAB, що використовуються для покращення певних властивостей МКБ/LAB. Загалом використання криптичних плазмід покращує

деякі властивості МКБ/LAB, такі як стійкість до бактеріофагів, стійкість до бактеріоцинів (наприклад, нізин), набуття стійкості до важких металів (кадмій, мідь), утилізація інших джерел вуглецю (наприклад, лактоза) тощо. Яскравим прикладом є підвищення стійкості до бактеріофагів завдяки кон'югативному перенесенню криптичної плазмиди стійкості до бактеріофагів.

Використання рекомбінації. Основною проблемою застосування криптичних плазмід є непридатність створених штамів до використання у промислових умовах, зазвичай через певну структурну нестабільність та нестабільність при мітозі.

Тому на заміну криптичним плазмідами висунуто інтегративні «суїцидні» вектори та вектори експресії, що містять регуляторні ділянки, які також мають статус «food-grade».

Інтегративне клонування гену призводить до специфічної вставки гена у хромосому бактерії без необхідності використання антибіотиків або інших маркерів резистентності. При інтеграції векторних систем у хромосому господаря використовується як гомологічна, так і сайт-специфічна рекомбінація. Загальною стратегією гомологічної рекомбінації є встановлення ділянок гомології між чужорідною ДНК та ділянкою ДНК, що споріднена для входження у хромосому. Для сайт-специфічної рекомбінації найбільш типовим прикладом є інтеграція бактеріофагів у хромосому хазяїна, що відбувається між сайтом attB у бактеріальній хромосомі та сайтом кріплення бактеріофага attP.

Саме використання різних типів рекомбінації дозволяє інтегрувати певні специфічні гени, у хромосому *Lc. lactis*, або ж гену фактору, що сприяє агрегації (arf) від *Lb. crispatus* до *Lcb. paracasei*, що забезпечило продукування антитіл, направлених проти ротавірусу. Використання МКБ/LAB, що модифіковані гомологічною або сайт-специфічною рекомбінацією є досить перспективним для використання у терапевтичних цілях.

Використання CRISPR-Cas9 для створення рекомбінантних пробіотиків. Системи CRISPR-Cas – це адаптивні імунні системи, що виявлено у бактерій та архей, які використовуються як програмовані інструменти для редагування геному еукаріотичних і прокаріотичних клітин. Саме Cas9-ДНК-ендонуклеаза системи CRISPR-Cas типу II є найбільш використовуваною серед білків сімейства Cas. Cas9 може створювати «тупі» розриви дволанцюгової ДНК, які не можуть відновлюватись у прокаріот, що є потужним інструментом контр селекції клітин дикого типу. Сьогодні система використовується у МКБ/LAB, наприклад відомо використання для *Lmb. reuteri*, *Lpb. plantarum* та *Lc. lactis*. Cas9 також використовувався для видалення великих мобільних генетичних елементів у *Str. thermophilus* та *Lc. lactis*. Інше використання системи CRISPR – регулювання експресії генів за допомогою інтерференції CRISPRi з каталітично неактивними варіантами Cas9.

Підходи системної біології для створення рекомбінантних пробіотиків. Сьогодні окрім досліджень *in vivo* та *in vitro* наявні можливості поєднання комп'ютерних методів для розробки та введення нових біоактивних властивостей пробіотиків та подальшого використання для позитивного впливу на мікробіом людини або в якості «cell factories» (фабрика мікробних клітин).

Існують чисельні методичні підходи *in silico* (комп'ютерне моделювання експерименту), які допомагають попередньо моделювати клітинні метаболічні шляхи та покращувати певні біосинтетичні властивості клітин, що може бути використано для різних пробіотиків.

Контрольні питання

1. Які переваги виготовлення мають лікувально-профілактичні пробіотики на основі бактеріальних векторів?
2. Які методи використовують для отримання цільового гена при конструюванні рекомбінантних мікроорганізмів, і які переваги та недоліки мають ці методи?
3. Вкажіть основні етапи конструювання рекомбінантних ДНК
4. Які методи введення чужорідної ДНК у пробіотики використовуються, і які з них є найбільш поширеними?
5. Як відбувається скринінг і відбір рекомбінантних клітин, що несуть не лише вектор, а й цільовий ген, під час процесу генетичних маніпуляцій?
6. Які основні методи конструювання рекомбінантних ДНК використовуються в генетичній інженерії?
7. Які недоліки пов'язані з застосуванням рекомбінантних плазмід для введення чужорідних генів у бактерії?
8. Які альтернативні методи введення чужорідної ДНК у пробіотики використовуються замість трансформації, кон'югації або трансдукції?
9. Які основні переваги використання системи CRISPR-Cas9 для створення рекомбінантних пробіотиків і як саме ця система використовується для модифікації мікроорганізмів?
10. Які підходи системної біології використовуються для створення рекомбінантних пробіотиків, зокрема використання комп'ютерних методів та метаболічної інженерії?
11. Які мікроорганізми, зокрема бактерії роду *Bacillus*, вважаються найбільш перспективними для створення рекомбінантних пробіотиків, і які методи використовуються для забезпечення стабільності та безпеки рекомбінантних штамів?
12. Які основні причини та переваги створення генно-модифікованих штамів бактерій роду *Escherichia* для використання в пробіотичних препаратах, зокрема щодо штаму *Escherichia coli* M-17 та його модифікації?

Завдання

Заповніть таблицю, в якій зазначені характеристика та застосування генетично модифікованих пробіотичних бактерій.

Штам	Генетичні модифікації	Антагоністична активність	Стійкість до антибіотиків	Переваги	Недоліки	Застосування

Bacillus subtilis 2335/105						
Bacillus subtilis pBCoIE2						
Escherichia coli M-17/pColap						
Escherichia coli CWG308:pLNT						
Lactococcus lactis MG 1363						
Bifidobacterium longum M2 05						
Saccharomyces boulardii						

Лабораторна робота 11

Отримання іммобілізованих пробіотиків

Пробіотики з використанням іммобілізованих мікроорганізмів (іммобілізовані пробіотики) порівняно з традиційними мають такі переваги:

- ◆ високу стабільність;
- ◆ високу життєздатність пробіотичних мікроорганізмів;
- ◆ стійкість до заморожування та сублімаційного сушіння;
- ◆ стійкість до дії рН, жовчних кислот, шлункового соку, що забезпечує виживання пробіотичних мікроорганізмів в умовах шлунково-кишкового тракту;
- ◆ підвищений термін зберігання;
- ◆ можливість зниження дози пробіотичних клітин у препараті.

Мікрокапсулювання

Мікрокапсулювання (інкапсулювання, мікроінкапсулювання) – це технологія пакування твердих, рідких чи газоподібних матеріалів у мінікапсули, вміст яких вивільняється з контрольованою швидкістю залежно від конкретних специфічних умов. Діаметр мікрокапсул становить від кількох мікрон до 1 мм. Зовні мікрокапсула оточена напівпроникною сферичною тонкою міцною мембраною (оболонкою), а всередині міститься цільовий матеріал (основа, або так зване тверде чи рідке «ядро»). У виробництві пробіотиків такою основою (ядром) мікрокапсул є біомаса пробіотичних культур. Власне, мікрокапсулювання у виробництві пробіотиків передбачає використання двох типів іммобілізації (включення у гель і у напівпроникні мембрани) залежно від природи використовуваних для формування оболонки (мембрани) речовин: полімери (розчинні та нерозчинні), ліпіди та ін. (рис. 3).

Характеристика іммобілізованих пробіотиків

До іммобілізованих препаратів пробіотиків, що є на ринку України, належать Біфідобактерин форте, Пробіфор, Флорин форте, а також Екофлор.

Біфідобактерин форте та Пробіфор – висушена мікробна маса живих біфідобактерій, іммобілізованих на активованому вугіллі. Одна доза Біфідобактерин форте містить не менш як $5 \cdot 10^7$ КУО, Пробіфору – $5 \cdot 10^8$ КУО біфідобактерій (*B. bifidum* 1).

Флорин форте містить клітини *B. bifidum* 1 та *L. plantarum* 8RA-3 ($5 \cdot 10^7$ КУО кожного штаму в одній дозі препарату), адсорбовані на активованому вугіллі.

Механізм дії цих препаратів зумовлений тим, що штучно створені сорбовані на частинках вугілля мікроколонії пробіотичних бактерій перебувають у такому фізико-хімічному стані, який забезпечує інтенсивнішу взаємодію з пристінковим шаром слизової оболонки кишечника, завдяки чому підвищує їхню антагоністичну активність. Об'єднання пробіотичних бактерій у мікроколонії забезпечує також їхнє високе виживання під час проходження через кисле середовище шлунка і досягнення високої локальної концентрації на поверхні слизової кишечника.

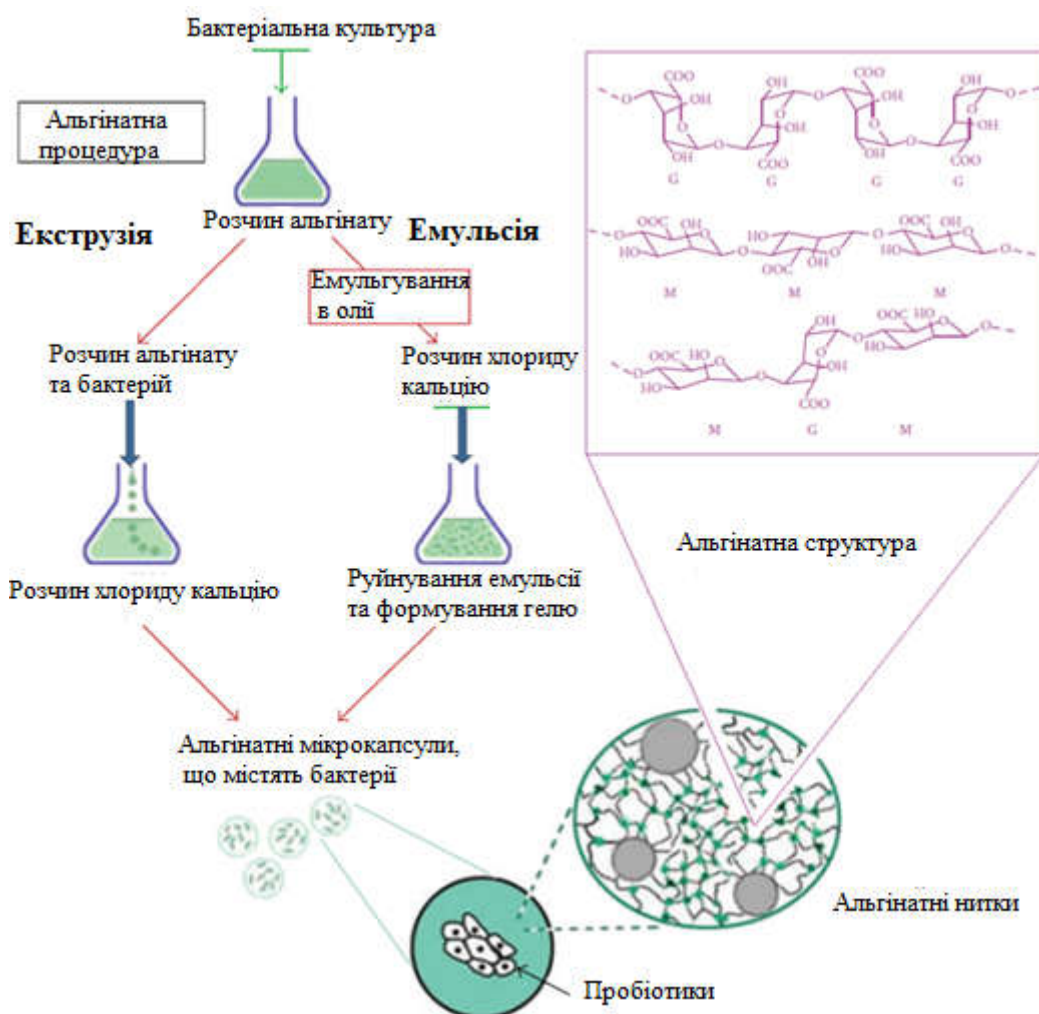


Рис. 3. Стадії екструзійних та емульсійних процесів, хімічна структура альгінатних залишків, а також принципова схема мікроорганізмів та гідрогелів

Швидка транзитрна колонізація екзогенними пробіотичними бактеріями сприяє нормалізації кількісного та якісного складу мікрофлори та стимулює репаративний процес слизової оболонки кишечника.

Пробіфор, окрім збільшення в дозі кількості живих біфідобактерій, містить меншу, ніж Біфідобактерин форте, кількість лактози, тому його доцільно використовувати під час дисахаридазної недостатності (дисахаридазна недостатність – синдром шлунково-кишкового розладу, зумовлений порушенням розщеплення (гідролізу) та всмоктування дисахаридів, зокрема лактози, сахарози, у тонкій кишці) у хворих на ротавірусну інфекцію та лактазної недостатності у дітей.

Флорин форте, що містить лакто- та біфідобактерії, характеризується ширшим антимікробним спектром, що в перспективі має забезпечувати його вищу ефективність під час комплексної терапії дисбіозу кишечника різного генезу.

Активоване вугілля є тонкопористим сорбентом з великою кількістю мікропор та високою питомою поверхнею. Внаслідок цього мікробні клітини, розміщені на поверхні частинок сорбенту, недостатньо захищені від несприятливого впливу середовища. Активоване вугілля поглинає низькомолекулярні гормони, вітаміни та гази кишечника, що погіршує роботу перистальтики. Воно працює переважно у верхніх ділянках шлунково-кишкового тракту. Крім того, вугілля не має антацидних властивостей, що не сприяє виживанню нанесених на них клітин під впливом середовищ з низьким значенням рН.

Бактистатин – унікальний продукт для конструювання продуктів біотехнологій і природних мінералів. Препарат складається з трьох компонентів: інактивовані клітини *B. subtilis* – пробіотична складова; гідролізат соєвого борошна – пребіотична складова; природний матеріал – алюмосилікат-цеоліт – носій.

Екофлор – унікальний комплекс біфідо- та лактобактерій, іммобілізованих на ентеросорбенті СУМС-1. Основою препарату є консорціум антагоністично активних видів біфідобактерій – *B. bifidum* та *B. longum* і лактобактерій – *L. casei*, *L. plantarum* та *L. acidophilus*.

Іммобілізована форма препарату дає змогу істотно підвищити захист біфідо- та лактобактерій під час проходження через шлунково-кишковий тракт, де зазвичай сухі препарати втрачають понад 90% активності. Біосорбент СУМС-1 крім захисту бактерій проявляє детоксикаційний ефект, адсорбуючи та виводячи з кишечника токсини, продукти незавершеного метаболізму та патогенні мікроорганізми.

Ентеросорбент СУМС-1 є вуглець-мінеральним комплексом (оксид алюмінію з гідрофільно-гідрофобною топологією поверхні, модифікований вуглецем), який застосовують у медицині для запобігання інтоксикації організму. Сорбент характеризують антацидні властивості. Має розвинену мезо- і макропористу структуру та об'єм макропор не менш як 0,01 см³/г у вигляді порошку з розміром частинок не більше ніж 0,1 мм або у вигляді гранул розміром 0,1-5,0 мм, або у вигляді таблеток. Порівняно з іншими ентеросорбентами (цеоліти, активоване вугілля) СУМС-1 має високу адсорбційну активність, не порушує водно-сольового балансу шлунково-кишкового тракту, не спричинює атонію кишечника та може застосовуватися тривалий час.

Препарат в іммобілізованій формі має триваліший термін зберігання та ефективнішу пролонговану лікувально-профілактичну дію.

Контрольні питання

1. У чому полягає процес іммобілізації?
2. Що таке іммобілізовані пробіотики? Які їхні переваги?
3. Назвіть методи іммобілізації.
4. Які методи іммобілізації можна застосовувати для живих клітин і чому?
5. Які речовини можна використовувати для іммобілізації клітин?
6. Які існують обмеження іммобілізації живих клітин?

7. Який спосіб іммобілізації є найбільш м'яким?
8. Які переваги палатінози як матеріалу-носія?
9. Які стадії передбачає іммобілізація у хітозан?
10. Що таке мікрокапсулювання?
11. Схарактеризуйте біополімери, які використовують для мікрокапсулювання.
12. Які матеріали-носії застосовують для іммобілізації пробіотиків?
13. Переваги сироваткового білка як полімеру для іммобілізації.
14. У чому полягає механізм дії іммобілізованих препаратів?
15. Які недоліки активованого вугілля як матеріалу-носія?
16. Які існують технології мікрокапсулювання пробіотиків?
Охарактеризуйте кожен з технологій.

Виробництво метаболітних пробіотиків

Незважаючи на широке застосування, бактеріальні препарати на основі живих мікроорганізмів не завжди виявляються високоефективними. Це зумовлено, з одного боку, швидкою елімінацією введених у агресивне середовище штамів унаслідок високої толерантності імунної системи до власної мікрофлори. З іншого боку, у разі потрапляння пробіотичного препарату в шлунково-кишковий тракт активізується лише 5% ліофілізованих бактерій.

Висока собівартість пробіотиків на основі живих мікроорганізмів також обмежує їхнє використання. Вирішення проблем корекції дисбіозів полягає у розробленні та впровадженні в клінічну практику препаратів пробіотиків, створених на основі мікробних метаболітів, які за новою класифікацією називають пробіотиками метаболічного типу. Метабіотики (М) являють собою структурні компоненти пробіотичних мікроорганізмів, та/або їх метаболіти, та/або сигнальні молекули з відомою хімічною структурою, які здатні оптимізувати фізіологічні функції, метаболічні, епігенетичні, інформаційні, регуляторні, транспортні, імунні, нейрогормональні, та/або поведінкові реакції, пов'язані з діяльністю симбіотичної (індигенної) мікробіоти організму-господаря.

Метабіотики в порівнянні з пробіотиками на основі живих організмів мають більш тривалий період збереження, чіткі мішені застосування, їх краще дозувати, їхню безпеку краще контролювати, вони краще абсорбуються, метаболізуються, розподіляються по організму, тканинам і органам, швидше і більшою мірою елімінуються з організму.

Перевагами метабіотиків порівняно з пробіотиками є:

- відома хімічна структура, чіткі точки прикладання;
- легке дозування, простіше контролювана безпечність;
- кращі абсорбування, метаболізм і розподіл;
- перебувають в активній формі та одразу починають діяти;
- висока біодоступність (надходять у товсту кишку в незміненому вигляді);
- не вступають у конфлікт із власною мікрофлорою людини;
- мають широку інгібувальну активність щодо різних видів патогенів;
- широкий антибактеріальний спектр та імуномодулювальна дія;
- швидше і більшою мірою елімінуються з організму;
- тривалий термін зберігання.

До метабіотиків належать низькомолекулярні речовини з різними хімічними властивостями. Основні види метабіотиків можна класифікувати так:

1. Метаболічні молекули (коротколанцюгові жирні кислоти, амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни, антимікробні сполуки, різні ферменти).

2. Сигнальні молекули (поліаміни, гормони, прості молекули (CH₄, H₂, S₂, NO, CO), мікроРНК, автоіндуктор-2).

3. Молекули, які мають специфічну структуру і функцію (імуномодулювальні молекули (інтерлейкіни-10 та -17), цитокіни, фактор

некрозу пухлин α , ліганди арил-вуглеводних рецепторів, молекули, асоційовані з пошкодженням).

Серед впливів, що надаються на організм людини метаболітами бактерій, слід зазначити: участь в енергетичних процесах, стимуляція власної індигенної мікрофлори, протимікробні та антагоністичні ефекти щодо умовно-патогенних та патогенних мікробів, підвищення чутливості до антибіотиків транзиторної флори та ін.

Показано можливість використання для виділення клітинних та метаболітних фракцій таких технологічних методів, як центрифугування, гідроліз, фільтрація. Аналіз даних літератури свідчить про 3 основні методи, що використовуються для виділення метаболітних і клітинних фракцій мікроорганізмів: 1. центрифугування або осадження з наступним відділенням супернатанту; 2. ультрафільтрація, що дозволяє розділити низько- та високомолекулярні речовини; 3. гідроліз. Найбільш раціонально використовувати процеси ультрафільтрації, оскільки вони дозволяють отримати в м'яких умовах максимально сконцентровану бактеріальну суспензію та ультрафільтрат для виробництва лікарських препаратів.

Контрольні питання

1. Що таке метаболітні пробіотики?
2. Як метаболітні пробіотики впливають на фізіологічні функції та біологічні реакції організму?
3. Чи можна спільно застосовувати пробіотики на основі живих мікроорганізмів і метаболітних пробіотиків?
4. Чому в Україні використання пробіотиків метаболічного типу не поширене?
5. Назвіть препарати метаболітних пробіотиків.
6. Які речовини входять до складу препарату Хілак форте? Як цей препарат впливає на мікрофлору кишечника людини?
7. Які технологічні особливості одержання препарату Хілак форте?
8. За допомогою яких методів з культуральної рідини можна виділити продукти метаболізму бактерій?

Список використаної літератури

1. Chralampopoulos D., Rastall R.A. Prebotics and Probiotics // *Science and Technology*. UK.: Springer, 2009. 1265 p.
2. Kourkoutas Yiannis *et al.* Immobilization Technologies in Probiotic Food Production // *Journal of Nutrition and Metabolism*. Volume 2013, 15 pages. 23 с.
3. Калініченко С. В., Бабич Є. М. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів // *Annals of Mechnikov Institute*, 2013, № 3. С. 5-12.
4. Кордон Т. І. Принципи створення, механізм дії та клінічне застосування пробіотиків (огляд) // *Annals of Mechnikov Institute*, 2014, № 2, С. 8-18.
5. Крисенко О. В., Скляр Т. В., Вінніков А. І., Сліпецька А. В. Мікробіологічні аспекти пробіотичних препаратів / *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія*. 2010. Вип. 18, т. 2. С. 19-24.
6. Милославський Д.К. Пробиотики: від Іллі Мечникова до сьогодні // *Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини*, 2020, № 2. С. 109-115.
7. Перспективи застосування пробіотичних та ферментних препаратів у свинарстві: Монографія / В. В. Малина, Л. В. Бондаренко, В. П. Лясота, В. А. Гришко, Ю. О. Балацький, С. П. Бабенко, О. О. Чернявський, М. М. Сломчинський, В. В. Болоховський, В. А. Болоховська, Біла Церква, 2017. 243 с.
8. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.
9. Пробиотики і пребіотики. Глобальні практичні рекомендації Всесвітньої Гастроентерологічної Організації. Київ : Diagen. 2021. 43 с.
10. Старовойтова С. О. Сучасні аспекти технології іммобілізованих пробіотиків // *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 4. С. 9-20.
11. Сучасні фармацевтичні технології: Навч. посібник до лабораторних занять магістрантів денної, вечірньої та заочної форми навчання спеціальності 8.110201 “Фармація” / Під ред. О. А. Рубан. – Харків.: Видво НФаУ, 2015. 249 с.
12. Технологія пробіотиків : ідруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. Київ : НУХТ, 2012. 318 с.
13. Храмов А. Г., Рябцева С. А., Будкевич Р. О., Ахмедова В. Р., Рідна А. Б., Маругіна Є. В. Пребіотики як функціональні харчові інгредієнти: термінологія, критерії вибору та порівняльної оцінки, класифікація // *Питання харчування*. 2018. Т. 87. № 1. С. 5-17.
14. Чижаєва А. В., Дудікова Г. М. Науковий огляд: теоретичні та практичні аспекти конструювання пробіотичних препаратів // *Науковий огляд. Біологічні науки*. 2017. № 2. С. 157-166.

Навчальне видання

ТЕХНОЛОГІЯ ПРО- ТА ПРЕБІОТИКІВ

Методичні рекомендації

Укладачі: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 5,4.
Тираж 20 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.