

ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОДЕРЖАННЯ ПРОБІОТИКІВ**С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Ю.М. Дорошко***Національний університет харчових технологій*

У статті розглянуто сучасні аспекти одержання пробіотичних препаратів. Підкреслено, що підвищення ефективності вітчизняного виробництва пробіотиків є актуальним завданням, для вирішення якого необхідна розробка елементів технологічної уніфікації. Основні стадії отримання пробіотичних препаратів, що пов'язані з накопиченням мікробної біомаси та її стабілізацією, є об'єктами інтенсивних досліджень. Розробка й практичне застосування однотипових поживних середовищ для культивування виробничих штамів бактерій і захисних середовищ для ліофілізації препаратів відображають сучасний рівень уніфікації технології пробіотиків.

Ключові слова: пробіотик, чисті культури, адгезія, антагоністична здатність.

Термін «пробіотик» широко використовується вже понад 50 років. Визначення його уточнювалося в процесі накопичення експериментальних даних. Останнє було запропоноване канадським професором мікробіології та імунології Г. Рейдом (2003 р.): пробіотики — це живі мікроорганізми, застосування яких в адекватних дозах призводить до покращення здоров'я хазяїна [1, 2].

Сучасні методи корекції порушень у мікробній екосистемі людини базуються на використанні широкого спектра бактеріотерапевтичних препаратів і продуктів функціонального харчування, збагачених пробіотичними мікроорганізмами (табл. 1).

Таблиця 1. Препарати і продукти для відновлення нормальної мікрофлори [3]

№ п/п	Група препаратів (продуктів)	Діючі компоненти
1	Пробіотики (фармацевтичні препарати, спеціальні продукти та біологічно активні добавки)	Жива біомаса фізіологічної мікрофлори
2	Препарати на основі інактивованих мікроорганізмів	Інактивована біомаса пробіотичної мікрофлори
3	Пребіотики	Речовини, що сприяють селективному збільшенню популяції фізіологічної мікрофлори у кишечнику
4	Синбіотики	Комплекс пробіотика та пребіотика
5	Препарати метаболітного типу	Фізіологічно активні метаболіти пробіотичної мікрофлори
6	Продукти функціонального харчування	Живі мікроорганізми, їхні метаболіти та/або інші сполуки, що позитивно впливають на кишкову мікрофлору
7	Нутрицевтики	Поживні субстрати, що сприяють оздоровленню кишечника

Незважаючи на достатньо широкий асортимент імпортованих і вітчизняних пробіотиків, актуальними залишаються проблеми їх вдосконалення, які полягають у:

- дослідженні фізіології перспективних виробничих штамів з метою підбору поживних середовищ для їх культивування;

- визначенні процесів сорбції пробіотичних бактерій як загальнобіологічного процесу;
- вивченні ролі продуктів метаболізму та біологічно активних речовин мікробної клітини для визначення природи адгезинів, механізму антагоністичної активності;
- розробці технології виготовлення комплексних препаратів на основі консорціумів бактерій з широким спектром антагоністичної активності;
- дослідженні синергічної та інгібіторної дії різних видів і штамів пробіотичних бактерій;
- розробці оптимальної форми випуску препаратів (порошок, таблетки із захисним покриттям, капсули, гранули, суппозиторії, мазі, гелі тощо), яка б забезпечувала збереження біологічних властивостей пробіотиків та простоту і зручність їх застосування;
- вдосконаленні методів контролю антагоністичної активності препаратів, що містять життєздатні мікробні клітини, та розробці методів визначення вмісту живих мікроорганізмів [2, 4—8].

Серед науково-практичних напрямків, пов'язаних з мікробною екологією, перспективними для розробки та реалізації є:

- розробка експресних молекулярних методів дослідження складу й активності мікробіоценозів людини і тварин;
- пошук нових пробіотичних функціональних субстанцій;
- дослідження й деталізація молекулярних, біохімічних та інших механізмів ефективності пробіотиків, пребіотиків і синбіотиків у профілактиці, лікуванні та збільшенні термінів ремісії за різних захворювань, асоційованих з дисбалансом мікробної екології травного тракту;
- поглиблена оцінка нешкідливості пробіотичних препаратів і продуктів харчування, які використовуються людиною;
- дослідження можливості використання представників нормальної мікрофлори як носіїв для конструювання різного роду бактеріальних і вірусних вакцин;
- створення сучасних біотехнологічних підприємств з виготовлення пробіотиків, пребіотиків, синбіотиків, стартерних заквасок прямого внесення, антибіотиків, імуномодуляторів, вітамінів, біогенно активних пептидів, біосенсорів тощо на основі представників нормальної анаеробної мікрофлори людини й тварин [2, 7, 9—11].

За однією з класифікацій препарати пробіотиків, які використовуються нині у клінічній практиці, поділяються на 7 поколінь (табл. 2).

Нині пробіотики випускаються у таких формах: ліофільно висушена біомаса у флаконах або ампулах; ліофільно висушена біомаса у желатинових капсулах; суппозиторії ректальні та вагінальні з ліофільно висушеної біомаси; ліофільновисушена біомаса, пресована в таблетки, вкриті розчинною у кишечнику оболонкою; лінгвальні таблетки, що розсмоктуються під язиком [1, 3, 4, 5, 8, 12—16].

Мікробіологічна практика свідчить, що ефективні середовища для культивування виробничих штамів бактерій можуть бути приготовлені із застосуванням поживних основ з досить широкого кола взаємозамінних субстратів тваринного, рослинного або іншого походження. Поживну основу, що містить необхідні нутрієнти для метаболізму різних мікроорганізмів, можна

Таблиця 2. Пробиотичні препарати різних поколінь [5]

Пробиотики	Склад мікрофлори	Концентрація клітин, КУО/дозу
I покоління — пробиотики на основі монокультур облигатної або факультативної нормофлори		
Біфідумбактерин	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10 ⁹
Колібактерин	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁹
Лактобактерин	<i>Lactobacillus fermentum</i> або <i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ⁸
II покоління — 2-4-компонентні пробиотики на основі облигатної, факультативної або транзиторної флори		
Біфікол	<i>B. bifidum, E. coli</i>	10 ⁸
Біфіформ	<i>Bifidobacterium longum, Enterococcus faecium</i>	10 ⁷
Лінекс	<i>Bifidobacterium infantis, Lactobacillus acidophilus, E. faecium</i>	10 ⁷
Капсули йогурту	<i>L. acidophilus, Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, B. bifidum, Streptococcus thermophilus</i>	10 ⁹
Симбіолакт композитум	<i>L. acidophilus, Lactobacillus casei, B. bifidum, Lactococcus lactis sp. lactis</i>	10 ⁹
III покоління — пробиотики на основі транзиторних мікроорганізмів		
Бактисубтил	<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁹
Біоспорин	<i>Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis</i>	10 ⁹
Ентерол-250	<i>Saccharomyces boulardii</i>	10 ⁷
А-бактерин (Аеробакт)	<i>Aerococcus viridans</i>	10 ⁸
Лактовіт форте	<i>Lactobacillus sporogenes, Bacillus coagulans</i>	10 ⁸
IV покоління — синбіотики (комбінація пробиотиків і пребіотиків) та іммобілізовані пробиотики		

використовувати як універсальний базовий компонент при конструюванні поживних середовищ різного призначення. При цьому з'являється можливість розробки уніфікованих комплексів поживних середовищ для виробничого застосування. Поживне середовище як структурна одиниця уніфікованого комплексу повинне складатися з двох частин: постійної (універсальної), що включає базовий субстрат, а також змінної (специфічної), що залежить від потреб конкретного виробничого штаму бактерій. Приготування такого середовища може включати окрему підготовку обох частин, а їх змішування можна здійснювати безпосередньо перед або в ході культивування мікроорганізмів [17].

Алгоритм конструювання уніфікованих комплексів поживних середовищ для промислового виробництва пробиотиків включає кілька необхідних етапів:

- попередній вибір поживних субстратів з урахуванням критеріїв біологічної цінності, доступності й економічності;
- отримання поживних основ та оцінка їх ефективності на моделі регламентованих поживних середовищ;

Пробіотики	Склад мікрофлори	Концентрація клітин, КУО/дозу
Екстралакт	<i>L. acidophilus</i>	10 ⁸
Біфілакт-екстра	<i>B. bifidum</i>	10 ⁸
Біфідумбактерин-форте	<i>B. bifidum</i>	10 ⁷
Пробіфор	<i>B. bifidum</i>	10 ⁸
V покоління — препарати на основі рекомбінантних генно-інженерних штамів		
Субалін	<i>B. subtilis</i>	10 ⁹
VI покоління — полікомпонентні пробіотики на основі лактобацил і біфідобактерій		
Probiotic	<i>Lactobacillus</i>	10 ⁹
Symbiolact	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	10 ¹⁰
Біфідум-Мульти-1,2,3	<i>Bifidobacterium</i>	10 ⁹
Полібактерин	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	10 ⁹
VII покоління — мультипробіотики		
Симбітер	<i>Bifidobacterium, Lactobacillus, Propionibacterium, Lactococcus</i>	10 ⁹
Симбітер концентрований		10 ¹³
Симбітер-2		10 ¹²
Симбітер-М		10 ⁹ —10 ¹²
Апібакт		10 ¹²

- розробка й оцінка способів отримання поживних основ з урахуванням критеріїв технологічності і трудомісткості;

- балансування складу поживних середовищ [1, 4, 5, 7, 17].

Прикладом такого підходу в практиці отримання пробіотиків є казеїноводріжджові середовища. Це пов'язано з тим, що вони відповідають вимогам промислового виробництва за сукупністю біологічних, технологічних і економічних параметрів [4, 5, 7].

Більшість пробіотиків випускаються у ліофілізованій формі (порошки, таблетки, капсули, супозиторії). Суха форма характеризується високим терміном зберігання, зручністю транспортування та зберігання, не вимагає суворого дотримання температурного режиму. Підвищення ефективності використання сублимаційного обладнання при традиційному випуску пробіотиків у вигляді сухої біомаси у флаконах та ампулах припускає застосування захисних середовищ, що дозволяють при збереженні життєздатності клітин забезпечити необхідну структуру (зовнішній вигляд) сухого препарату в умовах нетривалого та інтенсивного режиму висушування. Практика розробки захисних середовищ свідчить, що для мінімізації загибелі клітин і відходів продукції за фізичними властивостями склад кріопротектора для кожного виду бактерій повинен включати якісно і кількісно збалансований набір компонентів [1, 4, 5, 7, 8, 11].

Уніфікація захисних середовищ, що використовуються у виробництві пробіотиків, передбачає обмеження кількості компонентів, які необхідні у складі кріопротекторів для «жорстких» режимів сублимації. При таких режимах висушування негативний біологічний і структуродеформуючий ефект нівелюється збільшенням концентрації кріопротектора у мікробній суспензії. При цьому досягти поліпшення структури сухої біомаси значно складніше, ніж

отримати необхідну кількість живих клітин у сухому препараті. Вирішити вказані проблеми вдалося при використанні сахарозо-желатино-молочних захисних середовищ, що застосовуються в даний час у виробництві більшості пробіотичних препаратів [4, 5, 7, 17].

Проте ліофілізовані форми пробіотиків мають низку недоліків, зокрема характеризуються тривалим виходом мікробних клітин із стану анабіозу (8—10 год в оптимальних умовах культивування, які можна забезпечити лише в лабораторних умовах). В умовах шлунково-кишкового тракту (ШКТ) за цей проміжок часу більша частина пробіотичних клітин може елімінуватися, не встигнувши активізуватися, тому виробництво пробіотиків у сухій формі більше пов'язано з комерційним інтересом фірм-виробників, ніж із забезпеченням високої якості препаратів. В організмі людини значна частина ліофілізованої мікрофлори гине ще до реактивації в агресивних умовах ШКТ [5, 6].

Технологічні прийоми, 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 проявлення помітного ефекту. По-друге, під час транзиту через біотопи проксимальної ділянки ШКТ у більшості випадків пребіотик метаболізується [5].

Використання кислотостійких капсул не вирішує проблеми підвищення ефективності пероральних пробіотиків, оскільки висока кислотність ШКТ є лише однією з багатьох перешкод. Причому значимість цієї перешкоди нівелюється, якщо пероральний пробіотик приймається з їжею, яка є потужним фактором захисту мікрофлори від шлункового соку. Заслужовують на увагу та все ширше використовуються ректальні пробіотики [1, 4, 5].

Значно ефективнішими є «живі» пробіотики у вигляді рідкої суспензії у спеціальному захисному середовищі. У таких препаратах бактерії перебувають у фізіологічно активній формі та можуть діяти відразу після прийому препарату. Пробіотичні мікроорганізми у вигляді рідкої форми є активнішими, життєздатнішими в агресивних умовах ШКТ, не потребують тривалої реактивації, проявляють свою дію одразу після введення в організм. Крім того, така форма пробіотиків є найзручнішою для дітей [5].

Інноваційною лікарською формою пробіотиків є лінгвальні (пористі швидкорозчинні) таблетки, які одержують за технологією сублімаційного формування.

Це дає змогу отримувати бактеріальні препарати з високорозвиненою внутрішньою поверхнею (пористістю). Перевагою технології сублімаційного формування є одностадійне отримання таблетованої форми пробіотика з високою біологічною активністю, у той час як традиційна технологія багатостадійна і включає висушування та подрібнення біомаси, змішування порошка із допоміжними речовинами (наповнювачами, розпушувачами, зв'язуючими речовинами, барвниками тощо) та пресування під тиском. Технологія виготовлення таблеткової форми бактеріального препарату зводиться до однієї операції — сублімаційного висушування розливої по формах-матрицях суспензії клітин у складному захисному середовищі з додаванням в нього не менше 7—9 % баластних речовин

(структуроутворювачів, біопротекторів). Виробництво пористих таблеток не вимагає спеціального обладнання для вивільнення з форм, оскільки внаслідок ущільнення біоматеріалу у процесі висушування під вакуумом відбувається його відшарування від стінок форми-матриці, що дає змогу виймати сухі таблетки струшуванням [4].

Розробка методу конструювання пробіотиків у вигляді міцних мутуалістичних мультисимбіозів є значним прогресом у галузі удосконалення засобів бактеріальної терапії. Під час отримання інших комплексних пробіотиків певні монокультури просто змішуються у визначених пропорціях із дотриманням єдиної умови — відсутності антагонізму між компонентами. Такі комбінації штамів, вирощені у стандартних лабораторних умовах, є не правилом, а винятком з існування мікроорганізмів. Потрапляючи у біотопи людини в умови жорсткої конкуренції з іншою, добре адаптованою мікрофлорою, вони або гинуть, перетворюючись на їстівний субстрат, або значно знижують свою активність [5, 18—20].

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 сублімаційне 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 [1, 4, 5, 7, 21].

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 [1, 4, 5, 7, 17, 21].

Висновки

Завдяки результатам численних медичних досліджень пробіотики на основі живої фізіологічної флори людини на теперішній час розглядаються як ефективний метод відновлення складу та функцій нормальних мікробіоценозів людини, а поява нової науково обґрунтованої інформації з цього питання створює величезні перспективи для поповнення арсеналу пробіотиків новими ефективними бактеріотерапевтичними препаратами. Незважаючи на відносну простоту промислового виробництва пробіотиків, що зводиться до вирощування одного або кількох мікроорганізмів-пробіотів на відповідних поживних середовищах з подальшим висушуванням культуральної рідини за наявності захисних середовищ, кожний окремий мікроорганізм або композиція потребують ретельного дослідження, опрацювання режимів і перебігу технологічного процесу одержання пробіотичних препаратів.

Література

1. *Chralampopoulos D., Rastall R.A.* Prebotics and Probiotics Science and Technology.— UK.: Springer, 2009. — 1265 p.
2. *Soccol C.R., Vandenberghe L.P., Spier M.R. et al.* The potential of probiotics: a review // *Food. Technol. Biotechnol.* — 2010. — Vol.48. — № 4. — P. 413—434.
3. *Шендеров Б.А.* Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. — М.: ДеЛи принт, 2008. — 319 с.
4. *Петров Л.Н., Вербицкая Н.Б., Добрица В.П., Галкин Г.Н., Петров Н.Л.* Бактериальные пробиотики: биотехнология, клиника, алгоритмы выбора. — СПб.: ФГУП Гос. НИИ ОЧБ, 2008. — 136 с.
5. *Янковский Д.С., Дымент Г.С.* Микрофлора и здоровье человека. — К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. — 552 с.
6. *Шевелева С.А.* Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // *Вопр. питания.* — 1999. — № 2. — С. 32—40.
7. *Saarela M., Mongensen G., Fonden R., Matto J., Mattila—Sandholm T.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties // *J. Biotechnol.* — 2000. — Vol.84. — № 3. — P. 197—215.
8. *Мокин П.А., Семченко А.В., Несчисляев В.А.* Капсулированная форма пробиотических препаратов // *Научно-практический журнал. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* — 2009. — № 4. — С. 28.
9. *Osipov G.A., Verkhovtseva N.B.* Microecology of environment and human being: Mass-spectrometry and microbial markers approach // *Научно-практический журнал. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* — 2009. — № 4. — С. 18.
10. *Shenderov B.* Probiotics and functional foods as bases for supporting personal human being health // *Научно-практический журнал. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* — 2009. — № 4. — С. 23.
11. *Lacroix C., Yidirim S.* Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — Vol.18. — P. 176—183.
12. *Albertini B., Vitali B., Passerini N. et al.* Development of microcapsulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* // *Eur. J. Pharmac. Sci.* — 2010. — Vol.40. — P. 359—366.
13. *Bondarenko V.M., Rybalchenko O.V., Boldyrev A.G., Potokin I.L., Orlova O.G., Dobritsa V.P.* The use of SpheroCell adsorbents to produce immobilized probiotic preparation // *Научно-практический журнал. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* — 2009. — № 4. — С. 4.
14. *Anal A.K., Singh H.* Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial application and targeted delivery // *Trends Food Sci. Technol.* — 2007. — Vol.18. — P. 240—251.
15. *Krastanov A., Blazheva D., Slavchev A., Denkova Z.* Immobilized cell technology for probiotic and prebiotic production // *Научно-практический журнал. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* — 2009. — № 4. — С. 13—14.
16. *Гордиенко П.А., Чуешов В.И.* Разработка таблетированного синбиотика с кишечнорастворимым покрытием // *Научно-практический журнал. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* — 2009. — № 4. — С. М10.

17. Пирог Т.П., Игнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
18. Лукьянова Е.М., Янковский Д.С., Антипкин Ю.Г., Дымент Г.С. К вопросу о поликомпонентности пробиотиков // Здоровье женщины. — 2005. — № 3. — С. 186—194.
19. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Мультикомпонентные пробиотики группы «Симбитер»: итоги и перспективы биоконструирования и применения в клинической практике // Здоровье женщины. — 2006. — №3. — С. 181—188.
20. Янковский Д.С., Моисеенко Р.А., Дымент Г.С. Особенности отечественных мультипробиотиков // Современная педиатрия. — 2009. — №3. — С. 79—86.
21. Королюк Т.А.М., Нынь И.В. Биотехнологические проблемы конструирования и производства новых пробиотических средств // Научно-практический журнал. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. — 2009. — № 4. — С. 28.

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF PREPARING PROBIOTICS

S. Starovoytova, O. Skrotskaya, Yu. Penchuk, Yu. Doroshko

National University of Food Technologies

Modern aspects of preparing pro-biotic agents are considered in this study. Increasing the efficiency of a domestic production of probiotics is an actual task which requires developing the technological unification. The main stages of preparing the pro-biotic preparations involving the accumulation of microbic biomass and its stabilization are the objects of constant study. Development and practical application of the same nutrient mediums for cultivation of production strains of bacteria and protective environments for a liofilization of preparations reflect modern level of unification of technology of preparing probiotics.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ

С.А. Старовойтова, О.И. Скроцкая, Ю.Н. Пенчук, Ю.Н. Дорошко

Национальный университет пищевых технологий

В статье рассмотрены современные аспекты получения пробиотических препаратов. Подчеркнуто, что повышение эффективности отечественного производства пробиотиков является актуальной задачей, для решения которой необходима разработка элементов технологической унификации. Основные стадии получения пробиотических препаратов, связанные с накоплением микробной биомассы и ее стабилизацией, являются объектами интенсивных исследований. Разработка и практическое применение однотипных питательных сред для культивирования производственных штаммов бактерий и защитных сред для лиофилизации препаратов отражают современный уровень унификации технологии пробиотиков.

Ключевые слова: пробиотик, чистые культуры, адгезия, антагонистическое способность.