УДК 579.864.1:615.331

PRESERVATION VIABILITY OF THE CELLS AS GUARANTY OF QUALITY OF PROBIOTIC PREPARATIONS

V. Cherepanskyi, N. Hrehirchak
National University of Food Technologies

Key words:
Probiotic drugs
Domestic probiotics
Freeze drying

Article history:
Received 03.10.2019
Received in revised form 19.10.2019
Accepted 13.11.2019

Corresponding author:
N. Hrehirchak
E-mail:
g_natal@ukr.net

ABSTRACT

Nowadays in Ukraine there are problems of diseases of the gastrointestinal tract of different etiology. As a result of the decrease in the level of probiotics trains, in particular bifidobacteria and lactobacilli, digestive processes and the course of many basic biochemical processes in the body are disturbed, which in turn worsens the general condition of the organism and decreases its resistance to pathogenic and opportunistic microorganisms.

The main ways of prevention and treatment of diseases of the gastrointestinal tract are drugs belonging to the group of probiotics, the use of which allows to improve and restore the microflora of the intestine and mucous membranes of the human body, which leads to general improvement of health and prevents the development of chronic diseases.

Probiotics are quite widespread in the pharmaceutical market of Ukraine. However, overseas preparations occupy almost the entire market. Therefore, the production of domestic probiotics is an urgent task, since their main advantage is the adaptability of the strains of microorganisms used in them to the Ukrainian population.

Probably the most important stage in the production of probiotic preparations is the stage of drying. After all, this stage affects the final characteristics of the drug, such as the number of viable cells and shelf life of the drug. Significantly enhances cell survival during drying with a properly selected protective medium, but it is also important to properly select the drying process and the equipment for carrying it out. The most effective way of drying is freeze drying. Although there are potentially cheaper and faster drying methods such as spray drying, vacuum drying, and fluidized drying, none can match sublimation drying when it comes to maintaining cell viability.

DOI: 10.24263/2225-2924-2019-25-6-3

ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ЯК ЗАПОРУКА ЯКОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

В. В. Черепанський, Н. М. Грегірчак
Національний університет харчових технологій

Останнім часов в Україні дуже гостро постає проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів, зокрема біфідобактерій і лактобацил, порушуються процеси травлення та перебіг багатьох основних біохімічних процесів в організмі, внаслідок чого погіршується загальний стан організму та знижується його стійкість до дії патогенних й умовно-патогенних мікроорганізмів.

Основним засобом профілактики і лікування захворювань шлунково-кишкового тракту є препарати, що належать до групи пробіотиків, використання яких дає змогу покращити та відновити стан мікрофлори кишечника й слизових оболонок організму людини, що приводить до загального покращання стану здоров'я та запобігає розвитку цілої низки хронічних захворювань.

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко. Проте препарати закордонного виробництва займають майже весь ринок. Тому виробництво вітчизняних пробіотиків — актуальне завдання, оскільки їхньою принциповою перевагою є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення.

Чи не найголовнішим етапом виробництва пробіотичних препаратів є стадія висушування. Адже саме цей етап впливає на кінцеві характеристики препарату, такі як кількість життєздатних клітин і термін зберігання препарату. Значно підвищує виживання клітин під час сушіння правильно підібране захисне середовище, але й важливо правильно обрати процес сушіння та обладнання для його проведення. Найбільш ефективним способом сушіння є сублімаційна сушка (ліофілізація). Незважаючи на те, що існують потенційно дешевші та швидші методи висушування, такі як сушіння розпиленням, вакуумна сушка й сушка в киплячому шарі, жоден не може відповідати сублімаційній сушці, якщо мова йде про підтримку життєздатності клітин.

Ключові слова: *пробіотичні препарати, вітчизняні пробіотики, сублімаційна сушка.*

Постановка проблеми. Поширеність хвороб органів травлення (ХОТ) на сучасному етапі надзвичайно широка [1], а їх повсюдно зростаюча частота захворюваності оцінюється як епідемія. І у світі, і в Україні показники захворюваності на ХОТ прогресивно зростають, подвоюючись щодесятиліття. У структурі поширеності захворювань в Україні ці патології знаходяться на третьому місці, у структурі смертності — на четвертому [2].

Одне з провідних місць у структурі захворювань шлунково-кишкового тракту за тяжкістю перебігу, частотою ускладнень і летальності займають хронічні запальні захворювання кишечника, до яких у наш час відносять не-

специфічний виразковий коліт, хворобу Крона, синдром подразненого кишечника та ін. [1]. Ці хвороби мають періоди загострень і ремісій [3].

Актуальність проблеми визначається також значним поширенням хвороб органів травлення серед дітей та підлітків і не завжди задовільними результатами лікування. За останні два десятиліття одним із наслідків несприятливих змін у різних сферах життєдіяльності суспільства стало погіршення здоров'я дітей, у тому числі зростання хронічних форм соматичної патології. В Україні до 60% дитячого населення страждає від різних соматичних хвороб, причому захворюваність продовжує зростати [1].

Не менш поширеними є запальні захворювання статевих органів у жінок. За статистичними даними, вони займають перше місце серед усіх гінекологічних захворювань і є однією з причин порушення дітородної функції жіночого організму [4]. У таблиці 1 узагальнего кількість хворих за згаданими вище захворюваннями серед відповідних груп населення України.

Таблиця 1. **Поширеність захворювань серед відповідних груп населення,** млн осіб [1; 2; 4]

Захворювання за групами населення	Хворі	Здорові
Захворювання кишечника серед дітей	7 206	7 592 794
Захворювання кишечника серед дорослого населення	269 367	34 240 633
Запальні захворювання статевих органів серед жінок	275 754	22 382 832

У комплексній терапії вищезгаданих захворювань провідну роль відіграють пробіотичні препарати, ефективність яких залежить від біологічних властивостей бактерій виробничих штамів, що входять до їх складу. Наявність у пробіотиків високої антагоністичної активності щодо умовно-патогенних бактерій і помірно виражений рівень адгезивної активності є необхідними чинниками, що забезпечують порівняно швидке якісне і кількісне відновлення популяції аутофлори пацієнта, зокрема індикаторних видів лакто- і біфідобактерій [5].

Метою статті є дослідження ринку пробіотичних препаратів України та обґрунтування оптимального способу висушування пробіотиків для збереження максимальної кількості живих клітин.

Викладення основних результатів дослідження. Пробіотичні препарати на основі штамів лактобацил найбільш широко застосовують у клінічній практиці. Зазначені препарати призначаються при:

- хронічних колітах різної етіології, зокрема неспецифічних виразкових колітах, соматичних захворюваннях, ускладнених дисбактеріозами;
- в акушерсько-гінекологічній практиці для санації статевих шляхів при неспецифічних запальних захворюваннях геніталій і передпологовій підготовці вагітних групи «ризику» із порушенням чистоти вагінного секрету;
- лікуванні та профілактиці у дорослих і дітей з перших днів життя дисбіозу кишечника, що виникає внаслідок антибактеріальної, гормональної, променевої та інших видів терапії;
- лікуванні дисбіозів і запальних захворювань жіночої статевої сфери (бактеріальних вагінозів, у тому числі у вагітних, бактеріальних кольпітів, викли-

каних стафілококом та кишковою паличкою, сенільних кольпітів гормональної природи) [6].

На українському ринку лікарських препаратів переважають імпортні пробіотики. Так, станом на 1 січня 2016 року ринок пробіотиків мав такий вигляд: Німеччина — 20%; Словенія — 10%; Італія — 10%; Польща — 7%; Грузія —3%; Індія — 7%; Україна —16%; Канада — 17%; Франція —10%.

Як видно, закордонні фірми займають близько 80% українського фармацевтичного ринку в цій сфері. Станом на 1 січня 2016 року до Державного реєстру лікарських засобів України включено 30 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: ЗАТ «Партнер» (Росія), ТОВ «Бакорен» (Росія), «Віта-фарма» (Росія), «Мікроген» (Росія), НВРУП «Діалек» (Білорусь), «Pharmachion» (Болгарія), «Ferrosan» (Данія), «Institut Rosell Inc.» (Канада), «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «GenomBiotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Франція), «Mili Healthcare» (Велика Британія), «Merckle» (Німеччина).

Українська фармацевтична лінія пробіотичних препаратів представлена виробниками: ДП «Ензим» (Україна) — 1 препарат, ПрАТ «Біофарма» (Україна) — 4 препарати. Лікарські препарати цієї фармакотерапевтичної групи представлені на ринку України у вигляді таких лікарських форм: порошки, краплі, таблетки й капсули [6].

Наразі, станом на 1 жовтня 2019 року, закордонні фірми займають весь український фармацевтичний ринок в цій сфері, і до Державного реєстру лікарських засобів України включено 18 пробіотиків. Найпопулярніші фірми-виробники серед них: «Lek» (Словенія), «Biocodex» (Франція), «GenomBiotech» (Індія), «Sanofi-Synthelabo» (Італія), «Merckle» (Німеччина) [7].

Проведений аналіз асортименту лікарських засобів досліджуваної групи показав, що переважно це препарати, які містять біфідобактерії — 8%, колібактерії — 8% та лактобактерії — 32%, а також дріжджі — 27% [6].

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко і різняться за своїм складом та призначенням. За складом вони поділяються на монопробіотики та комплексні пробіотики. Монокомпонентні препарати — це монокультури живих мікроорганізмів, які містять представників нормальної мікрофлори кишечника. Перевагою монопробіотиків порівняно з іншими групами пробіотиків є те, що вони затримуються в організмі людини на триваліший період часу, що значно підвищує лікувальний ефект. Це пов'язано з тим, що використовувані мікроорганізми виявляються в усіх біотопах травного тракту.

Найбільш поширеними групами пробіотичних мікроорганізмів, які використовуються для виробництва монопробіотиків, є представники родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. Порівняно з біфідобактеріями, лактобактерії мають високу адгезію до слизових оболонок, що сприяє утворенню поверхневого захисного біошару, завдяки чому вони особливо важливі при патології шлунково-кишкового тракту та урогенітального тракту. Встановлено, що деякі види лактобактерій знижують ризик утворення каменів у нирках завдяки оксалат-модифікуючій активності [6].

Основою пробіотиків є живі клітини мікроорганізмів, адаптовані до певних умов існування, що досить сильно реагують на їх зміну. Симбіотична мікро-

флора людей, які проживають в регіонах з різними кліматичними умовами, раціонами харчування, не є абсолютно однаковими. Тому слід враховувати тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом.

Тобто найбільш високу ефективність проявляють пробіотики, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів. Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення. Тому створення пробіотиків на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори є актуальним і важливим завданням [8].

Технологічний процес виготовлення пробіотичних препаратів охоплює приготування посівного матеріалу, виробничий біосинтез, змішування культуральної рідини із захисним середовищем, розлив, сушіння пробіотичної маси, герметизація напівпродукту, пакування готової продукції, маркування і відвантаження. Зважаючи на те, що клітини бактерій у пробіотичних препаратах повинні бути живими, одним із головних питань, що стосуються рецептури пробіотиків, є втрата їх життєздатності після сушіння та під час зберігання. Наявність достатньої кількості життєздатних мікроорганізмів у складі пробіотичних препаратів вважається істотним критерієм їхньої якості. Для підвищення тривалої стійкості пробіотиків важливо зберегти їх у сухому вигляді зі зниженим рівнем вологи. Для сушіння пробіотиків можна виділити кілька методів, включаючи розпилювальну сушку, ліофільну сушку та вакуумну сушку, проте виживання мікроорганізмів при застосуванні різних методів сушіння різниться (табл. 2).

Таблиця 2. **Залежність виживання клітин від методу сушіння та способу їх захисту [9]**

Метод сушіння	Спосіб підвищення життєздатності	Культура мікроорганізмів	Життєздатність клітин без застосування способу, %	Життєздатність клітин із застосуванням способу, %
1	2	3	4	5
Розпилювальна сушка	Зниження температури на виході з 80°С до 60°С	*S. thermophilus* МК-10 та *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 151	12,7 8,0	69,5 22,1
Розпилювальна сушка	Використання азоту замість повітря	*L. lactissubsp. cremoris* ASCC930119	45,19	58,58
	Слабке осмотичне навантаження (0,3М NaCl, 30 хв) перед сушінням	*L. paracasei* NFBC	8,27	33,46
	Попередня обробка теплом (52°С, 30 хв)		4,3	24

Продовження таблиці 2.

1	2	3	4	5
Сублімаційна сушка	Додавання до середовища сахарози	*L. helveticus*	10	50
	Додавання до середовища знежиреного молока та трегалози	*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081	3	70
	Зниження температури заморожування	*L. brevis* (з –20°C до –60°C)	46,4	65,2
		L. salivarius I24 (з –30°C до –80°C)	44,35	65
Вакуумна сушка	Додавання до середовища сорбіту	*L. paracasei* F19	29	54
	Додавання до середовища трегалози	*L. acidophilus*	18,9	37,9
	Додавання до середовища гліцерину		15,4	29,5

Сублімаційна сушка, також відома як ліофілізація, є найбільш зручним і широко застосовуваним способом видалення води для підвищення стабільності зберігання пробіотиків [9]. Порівняно з іншими методами сушіння, такими як розпилювальна сушка, ліофілізація є дорогим процесом через порівняно високі витрати на інвестиції, експлуатацію й обслуговування, але процес ліофільної сушки надає багато переваг у результатах, отриманих з точки зору життєздатності, якості та часу зберігання пробіотичних культур. Ліофільна сушка також має переваги з точки зору характеристик кінцевого продукту, таких як стабільність у його складі, неушкодженість поживних речовин, зниження хімічної деградації, контроль кінцевої вологості та зменшення вмісту води в кінці процесу до дуже низьких рівнів. Сушка ліофілізацією — це процес, коли вода або інший розчинник заморожуються з подальшим її вилученням із зразка на завершальних стадіях ліофілізації. Цей процес поєднує в собі три етапи: (1) зразок заморожується при низькій температурі, (2) первинна сушка відбувається, коли лід сублімується під зниженим тиском, і (3) вторинна сушка відбувається як етап десорбції, де видаляється залишкова волога або її зниження до низького рівня [10].

Усі ці етапи відбуваються в сублімаційних сушарках, основними складовими яких є:

- сушильна камера, де відбувся процес ліофілізації, має форму циліндра з декількома арматурними ребрами для міцності. Камера та дверцята виконані з нержавіючої сталі. Камера містить як полиці для продукції, так і конденсатор пари, який розташовується збоку. Камера оснащена клапанами підключення вакуумної лінії, зливом і спуском вакууму. Камера має двоє дверцят на кожному кінці. Одні призначені для завантаження/вивантаження продукції, інші знаходяться на кінці конденсатора;

- полиці та вагонетки. Певна кількість «модулів» складається з декількох полиць, які призначені для завантаження виробів. Продукт поміщають у лотки, які завантажують на нагрівальні плити (полиці) в камеру апарата;

- конденсатор пари. Конденсатор пари розміщений у задній частині камери або нижній частині і побудований з круглої трубки діаметром 25 мм. Охолодження конденсатора пари відбувається шляхом прямого розширення. Розморожування накопиченого льоду з конденсатора пари відбувається водою, тож для пришвидшення циклу розморожування рекомендується використовувати гарячу воду.

Вакуумна система сублімаційної сушарки складається із сушильної камери, конденсатора, вакуумних труб, клапанів і резервного та утримуючого насосів. Вакуумна система є важливою для швидкої сублімації. У системі обігріву теплові плити охолоджуються і нагріваються теплоносієм. Це рідина, яка може бути охолодженою або нагрітою для забезпечення заморожування або нагрівання продукту під час циклу сушіння. Електричний котел безпосередньо нагріває рідину, а охолодження відбувається через проміжний теплообмінник. Відцентровий насос забезпечує примусову циркуляцію теплоносія [11].

Різні параметри процесу також можуть значною мірою впливати на життєздатність пробіотичних мікроорганізмів під час сушіння в ліофільному режимі, при цьому температура, за якої вони заморожуються, є ключовим параметром. В ряді досліджень показано, що чим нижча ця температура, тим кращі результати життєздатності [12].

Висновки

Отже, зважаючи на те, що ринок пробіотиків України майже повністю зайнятий продукцією закордонного виробництва, актуальним завданням є розширення ринку за рахунок виробництва конкурентоспроможних вітчизняних пробіотичних препаратів. Головною перевагою цих перпаратів є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення, що значно підвищує їхню ефективність порівняно з імпортними пробіотиками.

Пробіотики, виготовлені з моноштамових культур, характеризуються тривалішим лікувальним ефектом унаслідок того, що пробіотичні культури затримуються в організмі людини на триваліший період часу.

При цьому для збереження кількості живих клітин у складі пробіотичних препаратів і стабільності у процесі зберігання важливим є вибір відповідної техніки сушіння, яке є невід'ємним етапом їх виробництва. Найбільш високі показники за кількістю життєздатних клітин після процесу висушування та стабільності характеристик кінцевого продукту дає використання сублімаційної сушки. Незважаючи на те, що це дорогий і трудомісткий серійний процес, якість отриманого продукту знаходиться на достатньо високому рівні.

Література

1. Степанов Ю. М., Скирда І. Ю., Петішко О. П. Хронічні запальні захворювання кишечника: особливості епідеміології в Україні. *Гастроентерологія*. 2017. № 2, Т. 51. С. 97—105.

2. Рингач Н. О., Керецман А. О. Хвороби органів травлення: історичні паралелі змін класифікації та епідеміологічної ситуації. *Семейная медицина*. 2015. № 4, Т. 60. С. 137—141.

3. Життя по хвилинах: що потрібно знати про запальні захворюваннях кишечника? URL: https://ua.interfax.com.ua/news/press-release/587596.html (дата звернення: 20.09.2019).

4. Жилка Н. Я., Миронюк І. С., Слабкий Г. О. Характеристика деяких показників репродуктивного здоров'я жіночого населення України. *Лікарські відомості*. 2018. № 9, Т. 71. С. 1803—1808.

5. Лях В. Р., Червецова В. Г., Кричковська А. М. Пробіотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту. *CTAS*. 2018. № 1. Вип. 1. С. 72—77.

6. Хижняк О. С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату: Автореф. дис. … канд. фарм. наук. *Харків*. 2016.

7. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&atscode=A07FA (дата звернення: 01.10.19).

8. Янковский Д. С., Моисеенко Р. А., Дымент Г. С. Особенности отечественных мультипробиотиков. *Современная педиатрия*. 2009. Т. 25. № 3. С. 79—86.

9. Broeckx G., Vandenheuvel D., Claes IJ., and other. Drying techniques of probiotic bacteria a sanimportant step to wards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm*. 2016. № 505. P. 303—318.

10. Conde-Islas A., Jiménez-Fernández M., Cantú-Lozano D., and other. EffectoftheFreeze-Drying Processonthe Physicochemicaland Microbiological Propertiesof Mexican Kefir Grains. *Processes*. 2019. № 3, Vol. 7.

11. Vacuum freeze dryer (FD series). URL: https://www.liofilizador.com/upload/file/1561029497.pdf (дата звернення: 03.10.19).

12. Fenster K, Freeburg B, Hollard C, and other. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*. 2019. № 3, Vol. 7.