

УДК 579.26:573.6

ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ РІДКОГО ПРОБІОТИКУ З АЕРОКОКІВ**Риженко С.А., Кременчуцький Г.М. *, Бредихіна М.О., Дикленко Т.В., Дробот О.В., Степанський Д.О.,
Хілько Л.В., Вальчук С.І., Юргель Л.Г.,
Кондратьєв А.Ю., Кошева І.П.****Дніпропетровська обласна санітарно-епідеміологічна станція
Дніпропетровська державна медична академія**

Перспективним та актуальним напрямом останніх років є виробництво рідких пробіотиків, які мають ряд переваг перед сухими [1, 2], але вимагають розробки нових технологій їх виробництва [3, 4, 6 - 8, 11, 15, 16].

Загально визнану роль у підтримці здоров'я людини грають аерококи та інші пробиотичні мікроорганізми [9, 10, 19]. Їхня життєдіяльність: регулює співвідношення мікробіоти макроорганізму; гальмує ріст ракових клітин кишечника; пригнічує активність гнильних і патогенних бактерій; стимулює продукування вітамінів; активізує імунні процеси; забезпечує захист від кишкових інфекцій; нормалізує функції кишечника; бере участь у засвоєнні поживних речовин, вітамінів і мікроелементів.

Сьогодні при лікуванні й профілактиці різних захворювань широко використовуються пробіотики - бактерійні сухі або рідкі препарати з живих мікробних культур (аерококів, біфідобактерій і лактобактерій), призначені для корекції мікрофлори хазяїна та лікування ряду захворювань. Одним з таких препаратів є «А-бактерин» (siccum), що містить ліофільно висушену біомасу живих бактерій *Aerococcus viridans* 167 [13, 14].

На відміну від сухого, головна перевага рідкого «А-бактерина» полягає в тому, що бактерії в ньому перебувають у біологічно активній формі. Свій корисний вплив вони роблять негайно - відразу після прийому препарату, що привабливо відрізняє його від аналогічних сухих препаратів. Крім живих бактерій, рідкі пробіотики містять їх продукти життєдіяльності та корисні для організму людини біологічно активні речовини: незамінні амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни, стимулятори імунітету та продукції інтерферону [8, 18].

В той же час, добре відомо, що аерококи мають ряд особливостей в енергетичному обміні, потребах у ростових факторах, що є певними труднощами у розробці технології виробництва рідкого пробіотику. Аерококи як мікроаерофіли, ростуть тільки при обмеженій кількості кисню, продукують активні форми кисню (АФК), що є аутоінгібіторами.

Конструювання живильного середовища [12], що враховує біохімічні аспекти метаболізму пробіотичного мікроорганізму *A. viridans* дозволило приступити до розробки технології виробництва рідкого пробіотику «А-бактерин».

При конструюванні рідкого пробіотику керувалися наступними принципами:

1. забезпечення стабільності властивостей пробіотичного мікроорганізму;
2. функціональне структурування пробіотику (мікроорганізм, середовище вирощування, стимулятори, інгібітори і стабілізатори);
3. використання природних інгредієнтів, крім генетично модифікованих і токсичних;
4. стандартизація пробіотику при зберіганні по активності пробіотичного мікроорганізму і органолептичним властивостям.

Були враховані вимоги і рекомендації Продовольчої та сільськогосподарської організації Об'єднаних Націй (ФАО) і Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) для національних органів відносно пробіотиків [17].

Одержання біомаси необхідної концентрації виробничого штаму *A. viridans* № 167 у рідкому живильному середовищі супроводжується істотними труднощами.

По-перше, аерококи продукують перекис водню, надлишки якого є інгібіторами їх власного росту, що вимагає його нейтралізації.

По-друге, аерококи є гетеротрофами і вимагають присутності в ростовому середовищі стимуляторів росту і створення оптимальних умов вирощування.

По-третє, будучи мікроаерофілами, аерококи хоча і мають потребу в кисні для одержання енергії, однак не переносять концентрації кисню, що присутній у повітрі. Антиоксидантний захист клітин аерококу здійснюється функціонуванням глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази, а також за допомогою хімічної реакції між піровиноградною кислотою і водень пероксидом [9].

Метою дослідження був вибір оптимального середовища на базі рослинної сировини вирощування аерококів за умови вмісту аерококів у пробіотику не менш $1 \cdot 10^8$ колоній-утворюючих одиниць (КУО) у 1 мл при зберіганні до 3-х місяців.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єкт дослідження - популяція виробничого штаму *A.viridans* № 167, що вирощувалася в грибному живильному середовищі (грибний відвар гливи звичайної - *Pleurotus ostreatus*) [12].

У середовище додавався гідролізат рибного борошна до наявності в середовищі 150 мг % амінного азоту. Для нейтралізації активних форм кисню, насамперед перекису водню, у середовище додавалися антиоксиданти - вітамін С і вітамін Е в концентрації 10 мг на 1 л середовища. Для зменшення конвекції кисню в середовище додавався агар-агар до 0,1%.

Для накопичення біомаси *A.viridans* 167 застосовувалися рідкі живильні середовища різного складу, що виготовлені на основі бульйону грибів гливи звичайної: грибний бульйон; грибний бульйон з рівнем амінного азоту 150 мг %; грибний бульйон з додаванням різних вуглеводів, амінокислот і вітамінів.

У експерименті використані різні сполучення й концентрації (глюкоза, цистеїн солянокислий, цистин солянокислий, амонію хлорид, амонію нітрат, натрію сульфат, калій водень фосфат, калій водень діфосфат, магній сульфат, нікотинова кислота, пантотенат кальцію, інозит, аденін, натрію хлорид, аскорбінова кислота, вітамін Е, ембріональна теляча сироватка, глютамінова кислота, гліцин, натрію гідроселеніт, агар-агар).

Біомасу *A.viridans* для засіву у рідке живильне середовище накопичували у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА).

Після чого проводили мікроскопічний і біохімічний контроль чистоти культури, що виросла на середовищі. Контроль рівня концентрації мікробних клітин здійснювали шляхом титрування культури і висіву із рідкого живильного середовища на живильні середовища різного складу (МПА, ентерокок-агар, гонокок-агар, живильний агар з додаванням 1-3% дефібрінованої крові, середовище Блаурока).

Залежно від схеми досліду флакони із посівами залишали для інкубації ще на 24 години у колишньому обсязі або доводили середовищем з аналогічним складом до 200 - 400 мл, після чого знову проводили контроль концентрації мікробних клітин.

Результати досліджень обробляли із використанням методів варіаційної статистики [5] з розрахунком середніх рівнів (M) і помилки середніх величин (m).

Результати та їх обговорення

У таблиці 1 представлені результати досліджень характеру росту *A.viridans* на живильних середовищах із різними добавками.

Таблиця 1. Ростові характеристики *A. viridans* через 24 години росту при 37 °С

Найменування середовища	Концентрація мікробних кліток при висіві на МПА (КУО/мл; М±m)	
	без глюкози	із 1% глюкозою
Середовище № 1 (МПБ)	$5,7 \cdot 10^7 \pm 3,5 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^7 \pm 2,5 \cdot 10^6$
Середовище № 2 (грибний бульйон)	$2,4 \cdot 10^6 \pm 0,8 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6 \pm 0,6 \cdot 10^5$
Середовище № 3 (грибний бульйон зі змістом амінного азоту 150 мг %)	$1,4 \cdot 10^8 \pm 0,9 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^8 \pm 0,5 \cdot 10^7$
Середовище № 4 (МПБ зі стимулюючою сумішшю)	$1,7 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^6$

Примітки: 1. МПА – м'ясо-пептонний агар

2. МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

3. Стимулююча суміш (1% глюкози, 0,001% цистеїну солянокислого, 1% альгінату натрію)

Як видно із даних таблиці найбільш інтенсивний ріст *A. viridans* відзначається при вирощуванні в грибному бульйоні зі змістом амінного азоту 150 мг %.

Проведено дослідження впливу цистеїну солянокислого на накопичення живих клітин *A. viridans* у грибному бульйоні зі змістом амінного азоту 150 мг % і 1% глюкозою. Дані дослідження представлені у табл.2.

Таблиця 2. Вплив цистеїну солянокислого на ріст *A. viridans*

Зміст цистеїну солянокислого мг/л	Концентрація <i>A. viridans</i> у середовищі вирощування (КУО/мл; М±m)
0	$1,8 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^5$
100	$1,6 \cdot 10^7 \pm 0,3 \cdot 10^6$
200	$1,4 \cdot 10^7 \pm 0,1 \cdot 10^7$
400	$1,6 \cdot 10^7 \pm 0,1 \cdot 10^7$

Дані, що наведені у таблиці 2, свідчать, що цистеїн солянокислий стимулює ріст аерококів, але його концентрація понад 100 мг/л особливого значення не має.

У результаті проведених досліджень була обрана основа живильного середовища, що є невід'ємною частиною рідкої форми пробіотику «А-бактерин» наступної рецептури: грибний бульйон, аміний азот (NH₂) - 150 мг %, глюкоза - 1%, цистеїн солянокислий - 100 мг/л.

Були вивчені властивості клітин *A. viridans*, що отримані на стандартних середовищах і запропонованому середовищі культивування, для встановлення автентичності штаму мікроорганізму. На рис. 1 представлена морфологія клітин, що виростили у казеїновому бульйоні і на рис. 2 морфологія клітин, що виростили у запропонованому середовищі.

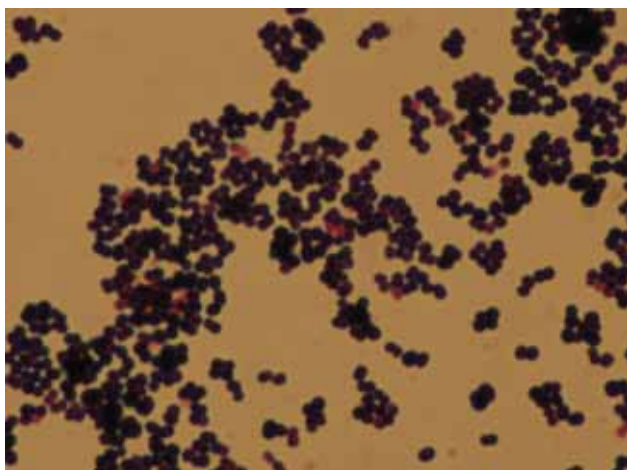


Рис. 1. Мікрофотографія клітин *A. viridans* 167, що виростили у казеїновому бульйоні. Фарбування за Грамом. Збільш. x 1000

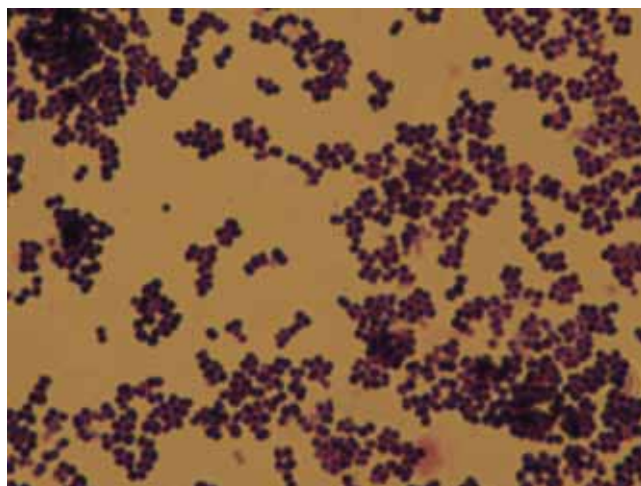


Рис. 2. Мікрофотографія клітин *A. viridans* 167, що виростили у грибному бульйоні. Фарбування за Грамом. Збільш. x 1000

Як видно на рисунках, морфологічних відмінностей *A. viridans* не спостерігається, що свідчить про відсутність впливу зазначених живильних середовищ на одну із ознак аерококу – морфологію клітини.

Підтвердження відсутності впливу досліджених живильних середовищ на біохімічні властивості *A. viridans* 167 надані у табл.3.

Таблиця .- Біохімічні властивості *A. viridans* 167, що вирощувався на різних живильних . середовищах

Тест або субстрат	Реакції	
	<i>A. viridans</i> , що вирощений у казеїновому бульйоні	<i>A. viridans</i> , що вирощений у грибному бульйоні
Рамноза	-	-
Ксилоза	-	-
Сахароза	+	+
Маніт	-	-
Крохмаль	+	+
Рафіноза	-	-
Інозит	-	-
Арабіноза	-	-
Сорбіт	-	-
Глюкоза (газ)	+	+
Желатіноза	-	-
Мальтоза	+	+
Дульцит	-	-
Аргінін	-	-
Лактоза	-	-
Глюкозний бульйон	Придонний ріст	Придонний ріст
Сольовий бульйон	-	-
Нітратний бульйон	-	-
Оксидна активність	+	+
Плазмокоагулаза	-	-

Примітки:

- + - ферментація вуглеводу
- - вуглевод не ферментується

Як видно із даних табл. 3 штами *A. viridans* 167, що вирощувалися на різних середовищах ідентичні по своїм біохімічним властивостям. Перевірка антагоністичних властивостей двох штамів і відношення їх до антибактеріальних препаратів також не виявила відмінностей

Висновки

- Визначено оптимальне живильне середовище для одержання рідкої форми пробіотику "А-бактерин®".
- Експериментально доведена можливість конструювання рідких форм пробіотиків із урахуванням біохімічних аспектів метаболізму пробіотичних культур та дотриманням вимог ФАО/ВООЗ.
- Розроблена принципова технологічна схема виробництва рідкої форми пробіотику "А-бактерин®".
- Встановлена ідентичність культур *A. viridans* 167, що вирощені на різних живильних середовищах по морфологічним, біохімічним і антагоністичним властивостям, а також відношенням до антибактеріальних препаратів.

Список літератури

1. Андреева М.А., Молокеев А.В., и др. Питательная среда для производства жидкого концентрата бифидобактерий // Биотехнология. – 1998. - № 4. – С.76-80.
2. Байбаков В.И., Молокеев А.В., Карих Т.Л., Никулин Л.Г. Новый высокопродуктивный производственный штамм бифидобактерий // Биотехнология. Теория и практика. – 2000. - № 3-4. – С.55-56.
3. Биотехнологические аспекты конструирования питательных сред для культивирования лактобацилл / Р.Х. Тимербаева, Е.В. Бобкова, М.М. Туйгунов // Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: матер. Всерос. науч. конфер. - Томск, 2004. - С. 133-136.
4. Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы 1-го Международного Конгресса. Москва, 14-18 октября 2002г. - М.: ЗАО "Максима", РХТУ им Д. И. Менделеева, 2002. - 544 с.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. - М.: Практика, 1998. – 459 с.
6. Калинина Т.Э. Питательные среды для культивирования бифидобактерий (биохимические подходы к конструированию) // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Ростов – на - Дону, 1995. – 23с.
7. Кигель Н.Ф. Технологии бактериальных препаратов для функциональных продуктов и биологически активных добавок // Автореф. дис. ... д-ра.тех.наук: 03.00.20. – К., 2003, – 41с.
8. Конструирование питательных сред для производства препаратов - пробиотиков / Р.Х. Тимербаева, Т.А. Баталова // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тест-систем: матер. III Международ. науч.-практ. конфер. - Махачкала, 2001. - С. 20-21.
9. Кременчуцкий Г.Н. Біологічні властивості А-бактерину // Медичні перспективи. - 2001. - Т.6, №3. - С.90-97.
10. Молокеев А.В. Байбаков В.И., Карих Т.Л. Разработка жидкого концентрата бифидобактерий для применения в медицине. Отчет 1911/НСО, Кольцово, ГНЦ ВБ «Вектор». – 1995. – 37с.
11. Осолодченко Т.П., Пасічник Т.О., Ніколаєнко В.М., Штикер Л.Г., Батрак О.А., Завада Н.П., Рябова -С., Щегініна В.М. Розробка живильного середовища для одержання біомаси *Staphylococcus aureus* // Аналіз Мечніковського інституту. – 2005. – № 1. – С. 22.
12. Пат. 53270, UA, Живильне середовище для виділення та ідентифікації мікроорганізмів / Г.М. Кременчуцький (Україна). № заявки 2002043159; Заявл. 15.01.2003. Опубл. 15.10.2004. Бюл. № 10. - 6 с.
Пат. 53301, UA, Спосіб одержання пробіотику з аерококів / Г.М. Кременчуцький (Україна). № заявки 2002043334; Заявл. 10.05.2002. Опубл. 15.01.2003. Бюл. № 1. - 7 с.

13. Риженко С.А., Черняев С.А., Кременчуцкий С.Г. Зміна біологічних властивостей усередині популяції *Aerococcus viridans* // Мед. перспективи. - 2002. - Т.7, № 2. - С. 18-21.
14. Романов В.Е. Оценка возможности использования питательных основ и сред из непищевого сырья для микробиологических и биотехнологических целей // Биотехнология, экология, медицина. Материалы III-IV Международных научных семинаров 2001-2002гг. Под редакцией д.т.н. А.Ф.Труфанова. Москва-Киров: ЭКСПРЕСС. 2002, -С. 78-84.
15. Технология сохранения жидких концентратов бифидобактерий и лактобацилл на основе стабилизированной активированной низкоминерализованной воды в метастабильном состоянии "МИС-РТ" - 2005 г. Сборник № 37. [Электронный ресурс]. <http://ikar.udm.ru/sb37-5.htm>.
16. FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. - 2002. [Электронный ресурс]. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
17. Hsu C.A., Yu R.C., Chou C.C. Production of beta-galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions //Int. J. Food. Microbiol. – 2005. Vol.104, №2: - P.197-206.
18. Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria.//Am.J.Clin.Nutr.- 2001.-Т.73 –S.393-398.

УДК 579.26:573.6

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИДКОГО ПРОБИОТИКА ИЗ АЭРОКОККОВ

С.А.Рыженко, Г.Н.Кременчуцкий *, М.О.Бредихина, Т.В.Дикленко, О.В.Дробот, Д.А.Степанский, Л.В.Хилько, С.И.Валчук, Л.Г.Юргель, А.Ю.Кондратьев, И.П.Кошевая
Днепропетровская областная санитарно-эпидемиологическая станция
Днепропетровская государственная медицинская академия

Изучена динамика роста культуры производственного штамма *A.viridans* № 167 на различных питательных средах и избрана оптимальная питательная среда для получения жидкой формы пробиотика «А-бактерин». Экспериментально доказана возможность конструирования жидких форм пробиотиков с учетом биохимических аспектов метаболизма пробиотических культур и соблюдением принципов и требований ФАО/ВОЗ. На основании полученных данных разработана принципиальная технологическая схема производства жидкой формы пробиотика «А-бактерин».

UDK 579.26:573.6

TECHNOLOGY OF CREATION OF LIQUID PROBIOTIC FROM AEROCOCCI

S.A.Rijenko, G.N.Kremenchutskyy, M.O.Bredichina, T.V.Diklenko, O.V.Drobot, D.A.Stepansky, L.V.Chilko, S.I.Valchuk, L.G.Urgel, A.U.Kondratiev, I.P.Koshevaya
Dnepropetrovsk regional sanitary-epidemiology station
Dnepropetrovsk state medical academy

The dynamics of growth of culture of production culture of *A.viridans* N 167 on different nourishing environments and an optimum nourishing environment is select for the receipt of liquid form of probiotics «A-bacterinum». Possibility of constructing of liquid forms of probiotics is experimentally well-proven taking into account the biochemical aspects of metabolism of probiotics cultures and by the observance of principles and requirements FAO/WHO. On the basis of the received data the basic technological scheme of manufacture of the liquid form of a probiotic is developed «A-bacterinum».