

УДК 579.864.1:615.331

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ТЕХНОЛОГІЇ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ПРОБІОТИКІВ

С. О. СТАРОВОЙТОВА

Національний університет харчових технологій, Київ

E-mail: svetik_2004@mail.ru

Отримано 11.10.2011



У роботі висвітлено сучасні аспекти технології іммобілізованих препаратів-пробіотиків та показано переваги іммобілізованих пробіотиків порівняно з іншими лікарськими формами бактеріотерапевтичних препаратів. Описано основні методи й особливості іммобілізації пробіотичних культур. Охарактеризовано основні матеріали-носії, що їх використовують у сучасній практиці для іммобілізації пробіотичних культур під час створення нових пробіотиків. Розглянуто речовини, що в перспективі можуть стати ефективними матеріалами-носіями у процесі іммобілізації пробіотиків. Показано, що матеріали-носії можуть застосовуватись як окремо, так і в комбінаціях один з одним, що дає змогу поліпшувати властивості готових лікарських форм іммобілізованих пробіотиків та збільшує термін їх придатності. Охарактеризовано сучасні іммобілізовані пробіотики, що представлені на ринку лікарських препаратів України, і описано їхні властивості. Проаналізовано позитивні та негативні сторони деяких іммобілізованих пробіотиків. Розглянуто технологічні аспекти отримання іммобілізованого пробіотика та обґрунтовано його компонентний склад.

Ключові слова: технологія, іммобілізація, адсорбція, пробіотики, пробіотичні культури, носій, іммобілізовані пробіотики.

Проблема використання ензиматичної активності іммобілізованих мікроорганізмів постала досить давно й не втратила актуальності до сьогодні. Публікації про іммобілізацію клітин мікроорганізмів з'явилися в 70-х роках ХХ ст. Найбільша кількість присвячених цьому досліджень та перше промислове застосування клітин мікроорганізмів було здійснено японськими дослідниками [1].

Іммобілізація за своєю суттю — це фіксування клітин мікроорганізмів у певній фазі, відокремленій від іншої, з можливістю міжфазної взаємодії. Фізико-хімічні принципи, що лежать в її основі, дають змогу закріпити структури таким чином, щоб їхня активність зберігалась упродовж тривалого часу, не зазнаючи структурних змін. Іммобілізовані клітини мають низку переваг перед вільними клітинами та іммобілізованими ензимами, зокрема більшу активність і стабільність, а також економічну ефективність. Іммобілізація дозволяє створити безперервні автоматизовані процеси, дає можливість тривалий час функціонувати поліензимним системам, незалежним від екзогенних факторів.

Для іммобілізації клітин мікроорганізмів можуть бути використані речовини органічної (хітин, деревина, целюлоза) та неорганічної (глини, вуглеводні, кераміка; сталактитові підкладки з подвійною структурою пор) природи. Зазначені підкладки мають наскрізні макропори, які уможливають вільний обмін рідини та газу із внутрішньої частини носія в навколишнє середовище, розмір макропор коливається у межах розміру клітин мікроорганізмів, але їх не використовують у медичній практиці. Застосовують також синтетичні матеріали (поліетилен, нейлон, поліуретани) і природні біодеградовані полімери (пектин, альгінат, хітозан, карагінан, фукоідан) [1–7].

Сьогодні достатньо актуальною є іммобілізація пробіотичних мікроорганізмів, що входять до складу пробіотиків та продуктів функціонального харчування. За сучасними уявленнями, пробіотики — це живі мікроорганізми та речовини мікробного походження, які під час природного способу введення справляють позитивні ефекти на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму хазяїна (людини або тварини) через оптимізацію та стабілізацію його мікробіоти.

Вчені з Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України в дослідях з іммобілізації пробіотичних культур застосовують такі ентеросорбенти: Ліферан, Лактофільтрум, Сорбекс, активоване вугілля, Атоксил, Мультисорб, СУМС-1. Зазвичай використовують ентеросорбенти, що містять активований вуглець, лігнін, целюлозу, діоксид силіцію, оксид алюмінію з плівкою вуглецю [5, 6].

Методи іммобілізації. Поширені методи іммобілізації клітин можна поділити на три групи: зв'язування на твердому носіїві, включення в просторову структуру носія та іммобілізація із застосуванням мембранної технології [1].

Під час іммобілізації живих клітин слід брати до уваги можливий негативний вплив використовуваних агентів на життєздатність клітин та метаболічну активність. Окрім цього, хімічна модифікація, якої зазнають клітини у процесі іммобілізації, може небажаним чином змінювати їхні властивості. Водночас позитивні сторони у разі використання м'яких умов іммобілізації свідчать про доцільність практичного застосування.

Іммобілізація за допомогою адсорбції та включення в просторову структуру біодеградабельних полімерів є найбільш м'яким та переважним для живих клітин способом фіксації. Клітини можна включати до полімерної сітки шляхом проведення полімеризації або реакції поперечного зшивання гелю в присутності клітин. Оскільки розміри клітин порівняно великі, то доцільно використовувати носії з низьким ступенем зшивання для зберігання необхідних дифузійних властивостей. Також можна проводити модифікацію іммобілізованих форм природними полімерами, що створюють захист від руйнівних факторів середовища [1, 7].

Іммобілізацію слід розглядати як процес забезпечення зберігання, стабільності та високої біологічної доступності біотехнологічного продукту. Перевагами іммобілізованих форм пробіотиків є такі:

- висока концентрація іммобілізованих бактеріальних клітин у сорбенті дає змогу виробляти стабільні препарати;
- адсорбція продуктів метаболізму дозволяє збільшити виживаність бактеріальних культур;
- іммобілізація надає клітинам стійкості до заморожування та ліофільного сушіння;
- підвищує виживаність пробіотичних культур у ферментованих молочних продуктах;
- робить бактеріальні клітини більш стійкими до впливу негативних факторів

довкілля, рН, жовчних кислот, шлункового соку, окиснення, висушування та сприяє їх виживаності в умовах шлунково-кишкового тракту (ШКТ);

- збільшує строк зберігання пробіотиків;
- дає змогу зменшити дозу пробіотичних клітин [1, 7].

Російськими вченими розроблено новий адсорбент, який успішно застосовують під час іммобілізації пробіотиків, — Сфероцел, що являє собою полісахаридний матрикс. Кожна гранула Сфероцелу має розмір близько 100–180 мкм і може адсорбувати майже 1 000 живих бактеріальних клітин, а 1 мл гранул адсорбенту містить приблизно 200–400 мг бактеріальних метаболітів. Клітини, іммобілізовані на Сфероцелі, мають пролонговану життєздатність у культуральній рідині понад 6 міс (табл. 1) і оптимальну фармакокінетику внаслідок градієнтної десорбції метаболітів із гранул адсорбенту. Сорбційна здатність Сфероцелу стосовно бактеріальних клітин залежить від заряду матриксу (рис. 1). За однакових умов іммобілізації позитивно заряджений Сфероцел адсорбує бактеріальні клітини в 3–10 разів ефективніше, ніж нейтральний, і в 20–25 разів ефективніше порівняно з негативно зарядженим (табл. 2) [4].

Таблиця 1. Строк зберігання іммобілізованих клітин *L. plantarum* 8PA-3 [4]

Термін зберігання, днів	КУО ¹ /мл суспензійних клітин	КУО/мл іммобілізованих клітин
1	$3,1 \cdot 10^{10}$	$3,1 \cdot 10^{10}$
30	$2,9 \cdot 10^{10}$	$3,1 \cdot 10^{10}$
60	$1,4 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^9$

Примітка: ¹КУО — колонієутворювальна одиниця.



Рис. 1. Клітини *L. plantarum* 8PA-3, іммобілізовані на позитивно зарядженому матриксі Сфероцелу [4]

Таблиця 2. Сорбційна здатність Сфероцелу [4]

Сфероцел	<i>L. plantarum</i> 8PA-3	
	Концентрація після сорбції ($\times 10^6$) КУО/мл	Сорбційна здатність ($\times 10^6$) КУО/мл
Аніоніт матрикс (+) заряд	1,4	33
	6,0	266
	16	604
	130	3100
Катіоніт матрикс (-) заряд	5,5	24
	16,4	350

Болгарськими вченими із SELUR holding запропоновано для іммобілізації використувати палатинозу, оскільки вона за фізичними та органолептичними властивостями подібна до цукрози; не канцерогенна, пригнічує формування нерозчинних глюканів; дуже повільно вивільняє моносахариди в кровотік; має біфідогенні властивості. Також вони розробили метод іммобілізації клітин *Serratia plymuthica* в хітозан, що складається з таких стадій:

- приготування хітозанацетатного розчину;
- приготування суспензії клітин в хітозанацетатному розчині;
- гелювання з утворенням поперечних зшивок за допомогою глутаральдегіду;
- фрагментація витискуванням через дрібні отвори;
- промивання 0,1М фосфатним буфером з рН 6,0;
- активація у свіжому живильному середовищі протягом 14 год;
- сушіння препарату за кімнатної температури упродовж 36 годин.

Хітозан було обрано як носій унаслідок низки його позитивних якостей: природний, нетоксичний, біодеградабельний полісахарид; протипухлинна активність; активація імунної системи; гіпохолестеринемічна активність; гіпотензивна активність; протигрибкова активність; антибактеріальна активність [5].

Відпрацьовано іммобілізацію в гранули хітозану культур *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. casei*, досягнуто сорбційної здатності на рівні 10^{10} КУО/г гелю [5].

Для іммобілізації мікроорганізмів застосовують різноманітні методи: фізичне захоплення в полімерну сітку, прикріплення або адсорбція на носій та мембранне захоплення.

У разі отримання біомаси в мікрокапсулах одночасно з формуванням мембрани вкрай важливо щоб краплинки утворювалися водночас із мембраною. Із цією метою було розроблено спеціальне обладнання та відібрано низку полімерів, що формують гель під впливом термоактивації або іонізації.

З метою розділення краплинок з вузьким розподілом за розміром використовують насосну систему під дією сили тяжіння, що забезпечує постійний безперервний потік рідини. У перших конструкціях генераторів краплин рідина складалася з розчину біомаси та розчиненого в ній полімеру. Після потрапляння до ванни-збірника, наповненої іонним розчином, мембрана полімеру поперечно зшивалася, утворюючи самостійні мікрокапсули, інкапсулюючи краплини біомаси всередину мембрани. У більш пізніх версіях передбачено застосування насадок (форсунок) для сумісного витискування з утворенням полімерної сітки навколо краплинки під час її падіння до ванни-збірника. Різновиди крапельної системи можуть бути визначені відповідно до наведених нижче принципів [7]:

- крапання під дією сили тяжіння у ванни-збірники;
- крапання за допомогою потоку повітря;
- крапання за допомогою електростатичної сили;
- відсікання ламінарного потоку під впливом вібрації;
- відсікання потоку під впливом обертання та вібрації;
- сумісне витискування за допомогою відсікання ламінарного потоку.

На рис. 2–5 показано різноманітні методи мікрокапсулювання.



Рис. 2. Крапельний метод за допомогою електростатичної сили (з дозволу Chralampopoulos D., Rastall R.A., 2009)

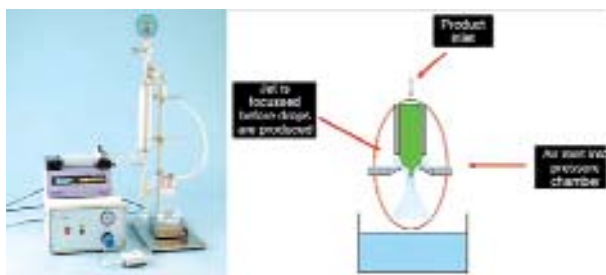


Рис. 3. Крапельний метод за допомогою аеродинамічного вприскування (з дозволу Chralampopoulos D., Rastall R.A., 2009)

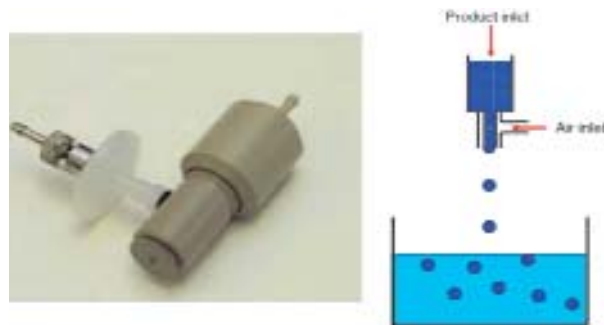


Рис. 4. Крапельний метод за допомогою коаксіального повітря (з дозволу Chralampopoulos D., Rastall R.A., 2009)

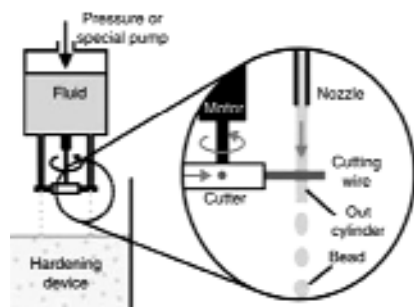
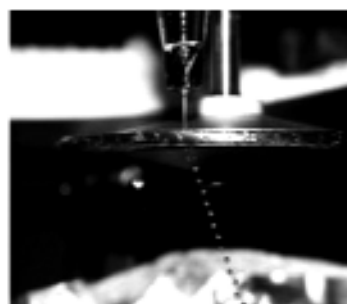


Рис. 5. Відсікання потоку (з дозволу Chralampopoulos D., Rastall R.A., 2009)



Використання статичних змішувачів також є перспективним, оскільки дозволяє працювати з великими об'ємами і знижує вартість виробництва. Пристрій складається з мішалки, що містить циліндрично (трубка) або квадратно розміщені елементи від 6 мм до 6 м у діаметрі. Елементи статичного змішувача складаються із серій екранів. Оскільки потоки рухаються через змішувач, нерухомі елементи безперервно змішують матеріали.

На доповнення до вищезазначеного слід додати, що використання конкретної технології мікрокапсулювання або матеріалу залежить від властивостей конкретного пробіотичного штаму (наприклад, кислоторезистентності, стійкості до кисню, стійкості до жовчних кислот). Дуже важко переносити результати мікрокапсулювання з одного штаму на інший, потрібно провести значну роботу для визначення та оптимізації придатного методу інкапсуляції.

Технології, широко застосовувані для мікрокапсулювання пробіотиків, та види матеріалів оболонки наведено в табл. 3.

Біополімери. Найбільш популярними для мікрокапсулювання мікроорганізмів біополімерами є такі.

Альгінат — один із найчастіше використовуваних для інкапсуляції мікроорганізмів

біополімерів. Міститься в клітинних стінках та міжклітинному просторі коричневих водоростей. Це лінійний співполімер, що складається з гомополімерних блоків, ковалентно зв'язаних в різних послідовностях залежно від джерела водоростей. Альгінова кислота — вільна кислота з альгінату — є проміжним продуктом комерційних альгінатів і має обмежену стабільність. Аби зробити стабільними водорозчинні продукти, альгінову кислоту перетворюють на одну з її солей, наприклад Са-альгінат, Na-альгінат, К-альгінат, Mg-альгінат, NH₄-альгінат. Відношення мануранової кислоти до глюконової та структура полімеру визначає властивості альгінату в розчині. Альгінати виробляють із широким спектром молекулярної маси. Альгінатні капсули формують шляхом крапання водного розчину альгінату в розчин, що містить мультивалентний катіон, зазвичай сіль кальцію. Іон кальцію атакує дві полімерні нитки з утворенням зв'язку, і таким чином формується дуже тонка сітка [9].

Карагінани — родина природних сульфатованих полісахаридів, що заповнюють порожнини целюлозної структури червоної водорості. Складаються із залишків галактози та 3,6-ангідрогалактози, з'єднаних по чергово глікозидними зв'язками. Поділя-

Таблиця 3. Технології мікрокапсулювання пробіотиків [8]

Технологія	Матеріал оболонки	Стадії мікрокапсулювання
Розпилювальне сушіння	Водорозчинні полімери	1) уведення клітин мікроорганізмів у розчин; 2) розпилювання в аерозоль; 3) випарювання розчинника; 4) відділення порошку
Розпилювальне охолодження	Ліпіди, воска	1) уведення клітин мікроорганізмів у розплав; 2) розпилювання в аерозоль; 3) затвердіння покриття охолодженням за температури, нижче температури танення
Покриття повітряною суспензією	Нерозчинні та розчинні у воді полімери, ліпіди, воска	1) приготування розплаву або розчину покриття; 2) псевдозрідження частинок основи — клітин мікроорганізмів; 3) розпилювання маленьких краплинок матеріалу покриття навколо частинок основи; 4) сушіння, застигання, кристалізація покриття з основою всередині
Витискування; відсікання потоку; статичний міксер	Водорозчинні полімери	1) розчинення клітин у полімерному розчині; 2) крапання розчину у ванну-збірник, де відбувається: – поперечне зв'язування полімеру з двовалентними іонами; – згущування полімеру термоактивацією; – комплексоутворення з поліелектролітами
Одночасне витискування	Водорозчинні полімери	1) подавання клітин у внутрішній вхід насадки (форсунки); 2) подавання полімеру на зовнішній вхід форсунки; 3) крапання клітин та полімеру у ванну-збірник; 4) поперечне зшивання полімеру з двовалентними іонами; 5) загущення полімеру термоактивацією

ються на три класи — *k*-, *i*- та *l*-карагінан, що мають різні властивості. З рослинних джерел методом екстракції отримують великі за розміром та різноманітні за властивостями молекулярні структури, зокрема карагінани з різними кількостями сульфатних груп, які по-різному з'єднуються з іонами металів. Усі види розчинні у гарячій воді, але лише *k*-тип розчинний у холодній воді. Утворення гелю карагінаном включає формування спіралі, що спричиняється охолодженням до кімнатної температури гарячого розчину карагінану. Іони калію та кальцію також необхідні для утворення гелю, оскільки вони стабілізують гелю, запобігаючи розбухання, або стимулюють гелеутворення.

Міцність капсул карагінану зростає з використанням камеді (смолисте виділення) ріжкового дерева у співвідношенні карагінан до камеді 2 : 1. Камедь ріжкового дерева належить до родини галактомананів. Вона екстрагується із зерен ріжкового дерева, створює харчовий резерв для насіння і допомагає утримувати воду під час засушливих умов. Камедь складається із залишків β -(1,4)-D-манози, приблизно кожен четвертий

залишок манози заміщений на боковий ланцюг α -D-галактози. Рівень заміщення впливає на властивості камеді, особливо на зв'язування галактоманану та утворення поперечних зв'язків усередині молекули. Камеді потребують нагрівання для розчинення у воді і їх рідко використовують як єдиний матеріал оболонки. Підвищення міцності капсул карагінан/камедь ріжкового дерева пояснюється синергічним ефектом, що пов'язаний зі взаємодією між подвійною спіраллю *k*-карагінану та нерозгалужених сегментів D-манози скелета камеді [7].

Хітозан — слабкий аніонний полісахарид, що складається переважно із залишків глюкозаміну та N-ацетилглюкозаміну, пов'язаних β -(1,4)-зв'язками. Його виготовляють деацетилюванням хітину, екстрагованого з панцирів ракоподібних. Має позитивний заряд, розчинний у воді при рН нижче 6,5, що дає змогу формувати поліелектролітні комплекси з негативно зарядженими матеріалами, наприклад поліфосфатами, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ та $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, і цитратом [7, 9].

Крохмаль — полісахарид, що складається з великої кількості моносахаридних залишків

глюкози, з'єднаних глікозидними зв'язками. Має молекули двох типів — амілоза (зазвичай 20–30%) та амілопектин (як правило, 70–80%). Обидві форми складаються з полімерів із залишків α -D-глюкози. На відміну від амілопектину, амілоза виконує корисну функцію як гідроколоїд. Хімічні модифікації крохмалів, такі як поперечне зв'язування, окиснення, ацетилювання та гідроксипропілювання, можуть забезпечувати певні корисні зміни у функціональності. Наприклад, ангідриди октенілсукцинової кислоти (OSAN)-модифіковані крохмалі популярні завдяки їхнім емульгувальним властивостям, оскільки містять як гідрофобні, так і гідрофільні групи. Окрім того, стійкий крохмаль, тобто такий, що не перетравлюється, є ідеальною поверхнею для адгезії пробіотичних мікроорганізмів під час виробництва, зберігання та проходження їх крізь ШКТ. Змішування крохмалю з *k*-карагінаном, альгінатом, ксантаном та низькомолекулярними цукрами часто застосовують у мікрокапсулюванні, оскільки вони зменшують реактивність крохмалю. Похідні крохмалю, головним чином гідролізовані форми, такі як декстрини та мальтодекстрини, також часто використовують як носії для розпилювального та ліофільного висушування [7].

Гуміарабік — гідроколоїд з ексудату акації. Оскільки це комплексна суміш молекул, яка різнилася за джерелом виділення, дослідження щодо визначення чіткої молекулярної структури тривають дотепер. Гуміарабік зазвичай складається з високорозгалуженої полісахаридної фракції, що містить галактозу, арабінозу, рамнозу та глюкуронову кислоту. Він також має у складі арабіногалактановий протеїновий комплекс, в якому арабіногалактанові ланцюги ковалентно зв'язані з протеїновим ланцюгом через серинові та гідроксипролінові групи. Протеїн відіграє важливу роль у функціональності гуміарабіку. Одночасна присутність гідрофільних вуглеводів та гідрофобного протеїну надає молекулі емульгувальних та стабілізуючих властивостей.

Гуміарабік використовують для виготовлення гуміарабік/желатин-коацерватів, застосовуваних як інкапсулюючі матеріали. Формування коацерватів можливе лише за значення рН, нижчих за ізоелектричну точку желатину, яка становить близько 8. При цьому значенні рН желатин набуває позитивного заряду, тимчасом як гуміарабік залишається негативно зарядженим. Формування стабільних мікрокапсул відбувається

також у разі використання сумішей гуміарабіку та сироваткового протеїну [10–12].

Пектин — основний компонент клітинної стінки рослин, що захищає від інвазії мікроорганізмів. Пектини складаються з α -D-галактуронової кислоти, яка переривається залишками α -L-рамнози. Суттєвою різницею між пектинами є вміст в них метилових ефірів. Ступінь етерифікації визначають за кількістю етерифікованих залишків D-галактуронової кислоти. Пектини з високим вмістом метоксилу формують гелі внаслідок гідрофобної взаємодії та утворення водневих зв'язків між молекулами пектину. Пектини з низьким вмістом метоксилу формують гелі в присутності ди- та полівалентних катіонів, які утворюють поперечні зв'язки і нейтралізують негативний заряд молекули пектину [7, 13].

Желатин — високомолекулярний поліпептид, що виробляється зі з'єднувальних тканин тварин, таких як кістки та шкіра. Протеїновий ланцюг розгортається під час нагрівання, утворює спіральну структуру і захоплює воду, формуючи оборотний гель під час охолодження. Желатин, отриманий після попередньої обробки кислотою, має значення ізоелектричної точки 7,0–9,4; а після оброблення лугом характеризується значенням ізоелектричної точки на рівні 4,5–5,3. Можливість варіювати значення ізоелектричної точки, і таким чином заряд, робить желатин доцільним для мікрокапсулювання. Однак для стабільності капсул потрібне поперечне зшивання; цитотоксичність традиційно застосовуваних органічних розчинників робить процес менш придатним для мікрокапсулювання. Але, як зазначалося раніше, желатин через його амфотерну природу використовують разом з аніонними вуглеводами для формування камедь/желатин-коацерватів [1, 7].

Сироватковий протеїн — це протеїн, отриманий із сироватки, маслянки, склотин та молока під час виробництва сиру. Його одержують ультрафільтрацією, під час якої низькомолекулярні сполуки, такі, як лактоза, мінерали, вітаміни та непротеїновий азот, видаляються з перміатом, тимчасом як протеїни концентруються. Після ультрафільтрації сконцентровані протеїни пастеризують, іноді випаровують та висушують, зазвичай розпилювальним сушінням, за низьких температур для запобігання значній денатурації протеїну.

Сироватковий протеїн є вкрай популярним завдяки його здатності утворювати плівки і використовується як захисний ма-

теріал під час розпилювального сушіння, який є кінцевим етапом у процесі приготування водорозчинних мікрокапсульних систем [11, 12].

Інші полімери. Існує великий вибір кислоторезистентних полімерів із запрограмованим вивільненням діючої речовини при значеннях рН кишкового тракту. Більшість із них застосовують для фармацевтичних цілей; водночас лише декілька мають схвалення для харчового використання: гідроксипропілметилцелюлоза, метилцелюлоза, етилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза фталат, гідроксипропілметилцелюлоза ацетат сукцинат, поліметилметакрилат, карбоксиметилцелюлоза, полівінілацетат фталат, метилцелюлоза фталат, целюлозоацетат фталат, полівінілацетат фталат, карбоксиполіметилен. Більшість із цих продуктів розчинні лише у спирті й не можуть бути залучені до прямого контакту з культурою; отже, їх можна застосовувати лише як поверхнєве покриття зовнішньої оболонки носія [1, 7].

Докладно вивчено використання альгінату для інкапсулювання пробіотиків. Встановлено, що розмір краплинок істотно впливає на виживаність клітин під впливом агресивних умов ШКТ. Краплинки розміром менше 100 мкм практично не захищають клітини біфідобактерій; захист посилюється зі зростанням розмірів краплинок, особливо для дуже великих краплинок розміром понад 1 мм [7, 14].

Крохмаль також широко досліджують як матеріал для інкапсулювання пробіотиків. Учені розробили технологію мікрокапсулювання зі включенням біфідобактерій до порожнистого ядра частково гідролізованих гранул крохмалю, які далі інкапсулюються із зовнішнім покриттям з амілози. Цю технологію застосовують для захисту пробіотичних бактерій від несприятливих умов навколишнього середовища під час проходження ШКТ та зберігання.

Суміші різних полісахаридів і в деяких випадках протеїнів також досліджували як потенційні матеріали для інкапсуляції пробіотиків. Наприклад, отримано позитивні результати в разі поєднання альгінату з пектином та сироватковим протеїном для захисту біфідобактерій під час проходження ШКТ. В іншому дослідженні було використано намистинки з альгінаткрохмального гелю для захисту *Lactobacillus acidophilus* та *Bifidobacterium lactis*, унаслідок чого клітини були захищені від токсичного впливу кисню. Також було продемонстровано, що

покриті хітозаном намистинки альгінату захищають різноманітні штами молочнокислих бактерій під час зберігання в молоці, так само як і в шлунковому соку. В іншому дослідженні полісахарид із ківі поєднували з альгінатом та хітозаном, що сприяло підвищенню виживаності *Lactobacillus rhamnosus* за низьких значень рН. Було запропоновано низьковартісну технологію мікрокапсулювання, яка передбачає покриття жирових краплинок молока, що містять порошкоподібні часточки ліофільно-висушених культур із сироватковим протеїном та полімерами з використанням емульгування та розпилювального висушування. У такому разі потрібен суровий контроль розмірів різних елементів, що складають капсулу. Зокрема, розмір матеріалу у вільній формі в гідрофобній фазі має бути більший, ніж у глобулярній формі [15–20].

Застосування полімерів як матриксів для іммобілізації пробіотиків під час ліофільного та розпилювального сушіння клітин також досліджують. Показано, що іммобілізація *Lactobacillus acidophilus* з *k*-карагінаном може збільшити температурну толерантність за ліофільного сушіння клітин та підвищити їхню стабільність під час зберігання. Слід звернути увагу на те, що роль специфічних полімерів, використовуваних для іммобілізації пробіотичних культур з метою збільшення їх виживаності під час зберігання, є штамозалежною [21].

У процесі розпилювального висушування більшість пробіотичних штамів не виживає за високої температури та осмотичного стресу. Температура, фазові зміни, сушіння — це стрес для клітин, що спричинює пошкодження їхніх мембран, унаслідок чого їхня активність втрачається після кількох тижнів зберігання за кімнатної температури. Один із методів, запропонованих для зменшення цього негативного впливу, — введення камеді акації до середовища сушіння; доведено, що це значно підвищує виживаність *Lactobacillus paracasei* за нестабільного температурного режиму зберігання [22].

Сучасні іммобілізовані пробіотики. До сорбованих препаратів-пробіотиків, що наявні на ринку України, належать Біфідумбактерин форте, Пробіфор, Флорин форте, а також Екофлор.

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

У складі Флорину форте є бактерії двох видів: *B. bifidum* 1 та *L. plantarum* 8RA-3, адсорбованих на активованому вугіллі у концентрації $5 \cdot 10^7$ КУО кожного штаму.

Механізм дії цих препаратів зумовлений тим, що штучно створені сорбовані на частинках вугілля мікроколонії пробіотичних бактерій перебувають в іншому фізико-хімічному стані, а це забезпечує більш інтенсивну взаємодію їх із пристінковим шаром слизової кишечника, що підвищує їхню антагоністичну активність. Об'єднання пробіотичних бактерій у мікроколонії сприяє також їх високій виживаності під час проходження через кисле середовище шлунка, дає змогу досягти високих локальних концентрацій на поверхні слизової кишечника. Швидка транзитрна колонізація введеними пробіотичними бактеріями допомагає нормалізувати кількісний та якісний склад мікрофлори і стимулює репаративний процес слизової оболонки кишечника.

Пробіфор, окрім збільшення в дозі кількості живих біфідобактерій, містить меншу кількість лактози, ніж Біфідумбактерин форте, тому його доцільно використовувати під час дисахаридазної недостатності у хворих на ротавірусну інфекцію та лактазної недостатності у дітей.

Антимікробний спектр Флорину форте, у складі якого є лакто- та біфідобактерії, ширший, що в перспективі має забезпечити його більшу ефективність під час комплексної терапії дисбактеріозу кишечника різного генезу.

Активоване вугілля як носій є тонкопористим сорбентом з великою кількістю мікропор та високою питомою поверхнею. Унаслідок цього мікробні клітини розташовані на поверхні частинок сорбенту й недостатньо захищені від небажаного впливу навколишнього середовища. Активоване вугілля поглинає низькомолекулярні гормони, вітаміни та гази кишечника, що погіршує перистальтику. Цей сорбент працює переважно у верхніх відділах ШКТ. Окрім того, вугілля не притаманні антацидні властивості, що не сприяє виживаності нанесених на нього клітин під впливом середовищ з низьким значенням рН [23, 24].

Зазначені препарати виробляє ЗАТ «Партнер», Російська Федерація.

Бактистатин — унікальний продукт в галузі конструювання комбінації продуктів біологічних технологій та природних мінералів. Препарат складається з трьох компонентів: 1) інактивовані клітини *Bacillus subtilis* — пробіотична складова; 2) гідро-

лізат соєвого борошна — пребіотична складова; 3) природний матеріал — алюмосилікат-цеоліт — носій.

Екофлор — унікальний комплекс біфідо- та лактобактерій разом з живильним середовищем 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*. Штами депоновано у Всеросійській колекції промислових мікроорганізмів (ВКПМ), їх застосовують у виробництві лікарських засобів. Препарат додатково містить захисне середовище, а клітини пробіотичних мікроорганізмів з живильним середовищем становлять сухий концентрат біфідо- та лактобактерій на молочній основі з титром 10^8 – 10^{10} КУО/г та вмістом амінокислот (мг/100 г сухої біомаси): глютамінової кислоти 15,0–68,0, глютаміну 8,0–20,0, лейцину 10,0–50,0, аргініну 20,0–30,0, цистеїну 50,0–80,0. Як захисне середовище використовують (% мас.): желатин (8,5–11,5), аскорбінову кислоту (0,2–0,8), хлористий натрій (1,7–3,0) та сахарозу (до 100%). Комплекс мікроорганізмів має імуностимулювальну активність, справляє позитивну дію на організм під час хронічних захворювань. Окрім того, забезпечує нормальну роботу ШКТ, сприяє виробленню та засвоєнню вітамінів, особливо групи В, і антибіотико-подібних речовин, що пригнічують ріст патогенних мікроорганізмів. Екофлор — це іммобілізована форма препарату, що дає змогу суттєво підвищити захист біфідо- та лактобактерій під час проходження через ШКТ, де зазвичай сухі препарати втрачають понад 90% активності. Як біосорбент використовують СУМС-1, який окрім захисту біомаси бактерій виявляє детоксикаційний ефект, адсорбуючи й виводячи з кишечника токсини, продукти незавершеного метаболізму та патогенні мікроби.

Для іммобілізації бактерій носієм слугує вуглецемінеральний комплекс (оксид алюмінію з гідрофільно-гідрофобною топологією поверхні, модифікований вуглецем) — ентеросорбент СУМС-1, що застосовується в медицині для запобігання інтоксикації організму, виводячи з кишечника токсини різного походження та важкі метали. Сорбентові притаманні антацидні властивості, він характеризується розвиненою мезо- та макропористою структурою і об'ємом макропор не менше $0,01 \text{ см}^3/\text{г}$ у вигляді порошку розміром частинок не більше 0,1 мм або гранул розміром 0,1–5,0 мм, або таблеток.

Порівняно з іншими ентеросорбентами (цеолітами, активованим вугіллям тощо) СУМС-1 має високу адсорбційну активність, не порушує водно-солевого балансу в ШКТ, не викликає атонії кишечника і може застосовуватися тривалий час [2].

Препарат в іммобілізованій формі має довший термін зберігання та більш ефективну пролонговану лікувально-профілактичну дію.

Обґрунтування складу препарату Екофлор

Концентрат біфідобактерій містить такі компоненти живильного середовища: стерильне знежирене молоко, панкреатичний гідролізат молока та автолізат хлібопекарських дріжджів. Наявність у живильному середовищі панкреатичного гідролізату протеїнів молока забезпечує збагачення концентрату сумішшю високомолекулярних та низькомолекулярних пептидів, що є ефективними стимуляторами росту біфідобактерій.

Автолізат хлібопекарських дріжджів має у складі вітаміни і фактори стимуляції росту біфідобактерій.

Уведення до препарату сухої мікробної біомаси з титром 10^8 – 10^{10} КУО/г забезпечує йому оптимальну біологічну активність. Якщо титр вихідної мікробної біомаси менше 10^8 КУО/г, то препарат має недостатню біологічну активність і під час введення в ШКТ виявляє слабкий лікувально-профілактичний ефект. Титр сухої біомаси більше 10^{10} КУО/г істотно збільшує вартість препарату без значного підвищення лікувально-профілактичного ефекту.

Основу рідкої бактеріальної зависі для сушіння становлять клітини в молочному живильному середовищі з підвищенням титром клітин (10^9 — 10^{11} КУО/мл) — рідкий концентрат біфідобактерій. Молочне живильне середовище з пробіотичними клітинами містить підвищену кількість протеїну (не менше 12% сухого залишку молока), що дає змогу посилити антибіотичні властивості препарату. Крім того, підвищена кількість протеїну підвищує антацидні властивості препарату. Висока концентрація клітин в рідкій бактеріальній суспензії дозволяє використовувати їх під час приготування препарату в сухому вигляді в концентрації 0,1–1,0% з титром 10^8 – 10^{10} КУО/мл.

Живильне середовище з рідким концентратом біфідобактерій додатково збагачують важливими замінами та незамінними амінокислотами, що мають анаболічні та антиоксидантні властивості.

Перед сушінням антиоксидантні властивості рідкого концентрату підсилюють за допомогою спеціального захисного середовища, що створює максимальні умови анаеробіозу, які важливі для облігатних анаеробів — біфідобактерій. Основними речовинами, що забезпечують анаеробіоз, є цистеїн та аскорбінова кислота.

Як додатковий пробіотик вводять бактеріальну суспензію ацидофільних лактобактерій одного або декількох штамів, які виявляють колонізаційну активність у кишечнику.

Іммобілізуючий матеріал окрім адсорбції пробіотичних бактерій у великих макропорах адсорбує в дрібних мікропорах незамінні амінокислоти з анаболічними та антиоксидантними властивостями, а також аскорбінову кислоту і доставляє їх у нижні відділи кишечника — товстий кишечник, де найбільш активно відбуваються процеси детоксикації організму. Окрім того, амінокислоти, потрапляючи із сорбенту в кров, активізують детоксикаційну роботу нирок і захищають їх від уражень. Амінокислоти також знижують певну індивідуальну непереносимість організму до СУМС-1.

Носій-сорбент — це механічно міцні частинки порошку або гранули чи таблетки, виконані з оксиду алюмінію, поверхню яких модифіковано вуглецем. Сорбент має питому поверхню $300 \text{ м}^2/\text{г}$ та розвинену структуру мезо- і макропор. Розміри макропор сорбенту коливаються у межах розмірів мікробних клітин, що дає змогу заповнювати макропори пробіотичними клітинами. Регулювання відсоткової частки вуглецю в сорбенті з подальшим окисно-відновлюваним його обробленням забезпечує отримання носія із заданими гідрофільно-гідрофобними та іншими топонімічними характеристиками. Сорбенти типу СУМС меншою мірою, ніж інші аналогічні матеріали, вивільняють вітаміни та гормони з організму, не порушуючи перистальтику, що уможлиблює їх застосування тривалими курсами. Наявність у сорбенті оксиду алюмінію надає його поверхні певних буферних антацидних властивостей, що сприяє кращому збереженню активності та виживанню іммобілізованих на ньому мікробних клітин, наприклад під час проходження препарату через шлунок (усуває негативний вплив шлункового соку на мікробні клітини) або за інших несприятливих умов (низьких значень рН).

Макропориста структура носія, комірочки якого заповнені пробіотичними клітинами, також сприяє захистові цих іммобілізованих

клітин від інактивуючих факторів навколишнього середовища. Причому, мікробні клітини, що містяться в порах, та клітини, що розташовані близько до зовнішньої поверхні носія-сорбента, різняться за своїми десорбційними властивостями, така неоднорідність властивостей клітин забезпечує пролонговану дію препарату та сприяє колонізації не лише верхніх, але й нижніх відділів кишечника. Пористий носій як ентеросорбент знімає ефекти місцевого (а через нього і загального) токсикозу, що сприяє виживаності бактерій препарату та мікрофлори кишечника, а також знижує навантаження на органи детоксикації хазяїна.

Окрім того, якщо використовувався препарат містить біфідо- та лактобактерії, забезпечується не лише витіснення з ШКТ патогенних мікроорганізмів (завдяки їхнім антагоністичним властивостям), але й відновлення збідненої мікрофлори кишечника під час дисбактеріозу та інших хворобах.

За вільного об'єму пор сорбенту менше 0,01 см³/г не забезпечується достатня кількість іммобілізованих мікробних клітин у препараті (близько 0,1%). Препарат із вмістом мікробної біомаси менше 0,1% мас. має низький титр з переважанням міцно зв'язаних із сорбентом клітин, тобто діє переважно як ентеросорбент.

Вільний об'єм пор сорбента становить не більше 1,0 см³/г, тобто кількість мікробної біомаси (клітини та компоненти живильного середовища), яка може міститися в порах сорбента, не перевищує 1,0 см³ на 1 г сорбен-

ту, тобто на сорбенті може бути іммобілізовано мікробних клітин до 50% мас. Проте кількість мікробних клітин, що їх уводять до препарату, не перевищує 10% мас, тобто вся біомаса клітин препарату перебуває в захищеному стані. При цьому ентеросорбент СУМС зберігає основні свої властивості — зв'язування та виведення з кишечника токсинів, продуктів незавершеного метаболізму і патогенних мікроорганізмів.

Таким чином, іммобілізовані форми пробіотиків є більш перспективними, оскільки мають низку переваг порівняно з іншими лікарськими формами препаратів-пробіотиків: висока концентрація іммобілізованих бактеріальних клітин у сорбенті дає змогу виробляти стабільні препарати; адсорбція продуктів метаболізму дозволяє збільшити виживаність бактеріальних культур; іммобілізація надає клітинам стійкості до заморожування та ліофільного сушіння; покращує виживаність пробіотичних культур у ферментованих молочних продуктах; робить бактеріальні клітини стійкішими до впливу негативних факторів — рН, жовчних кислот, шлункового соку, окиснення, висушування та сприяє їх виживаності в умовах ШКТ; збільшує термін зберігання пробіотиків; дає змогу зменшити дозу пробіотичних клітин. Препарат в іммобілізованій формі має більш тривалий строк зберігання та ефективнішу пролонговану лікувально-профілактичну дію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Корочинский А. В., Верниковский В. В., Степанова Э. Ф. Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // Усп. совр. естеств. — 2010. — № 5. — С. 34–38.
2. Пат 2164801 RU, 7 МПК А61К35/74, А23С9/12, С12N1/08. Препарат-пробиотик в сухой иммобилизованной форме / А. В. Молокеев, Л. Г. Никулин, Р. М. Ильина, Э. В. Криничина, Т. Л. Карих, Н. В. Молокеева, В. И. Байбаков, М. А. Андреева, Н. В. Соболева. — Заявл. 06.12.1999, Опубл. 10.04.2001; Бюл. № 2.
3. МУК 4.2.577-96: Метод. указания. Методы контроля, биологические и микробиологические факторы. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебно-питания и их компонентов. — 56 с.
4. Bondarenko V. M., Rybalchenko O. V., Boldyrev A. G. et al. The use of Spherocell adsorbents to produce immobilized probiotic preparation /Abstracts of XXXII International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease // Науч.-практ. журн. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. — 2009. — № 4. — С. А4.
5. Krastanov A., Blazheva D., Slavchev A., Denkova Z. Immobilized cell technology for probiotic and prebiotic production /Abstracts of XXXII International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease // Ibid. — 2009. — № 4. — С. А13–А14.
6. Vysekantsev I. P., Babinets O. M., Martsenyuk V. F., Shatilova L. E. Cryopreservation effect on viability of *Saccharomyces boulardii* yeasts adsorbed on enterosorbents /Abstracts

- of XXXII International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease // *Ibid.* — 2009. — № 4. — С. А31.
7. *Chralampopoulos D., Rastall R. A.* Prebiotics and Probiotics Science and Technology. — UK.: Springer, 2009. — 1265 p.
 8. *Anal A. K., Singh H.* Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery // *Trends Food Sci. Technol.* — 2007. — V. 18. — P. 240–251.
 9. *Ying D. Y., Parkar S., Luo X. X. et al.* Microencapsulation of probiotics using kiwifruit polysaccharide and alginate chitosan // *Proceedings of the 6-th International Symposium on Kiwifruit.* — 2007. — V. 2. — P. 801–808.
 10. *Dror Y., Cohen Y., Yerushalmi-Rozen R.* Structure of gum arabic in aqueous solution // *J. Polym. Sci. Part B — Polymer Phys.* — 2006. — V. 44. — P. 3265–3271.
 11. *Weinbreck F., Minor M., De Kruif C. G.* Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates // *J. Microencaps.* — 2004. — V. 21. — P. 667–679.
 12. *Picot A., Lacroix C.* Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt // *Intern. Dairy J.* — 2004 — V. 14. — P. 505–515.
 13. *Wehr J. B., Menzies N. W., Blamey F. P. C.* Alkali hydroxide-induced gelation of pectin // *Food Hydrocol.* — 2004. — V. 18. — P. 375–378.
 14. *Chandramouli V., Kailasapathy K., Peiris P., Jones M.* An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions // *J. Microbiol. Meth.* — 2004. — V. 56. — P. 27–35.
 15. *Champagne C. P., Fustier P.* Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007 — V. 18 — P. 184–190.
 16. *Gouin S.* Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends // *Trends Food Sci. Technol.* — 2004. — V. 15. — P. 330–347.
 17. *Lacroix C., Yidirim S.* Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality // *Curr. Opin. Biotechnol.* — V. 18. — P. 176–183.
 18. *Wu Y., Bao C., Zhou Y.* An innovated tower-fluidized bed prilling process // *Chin. J. Chem. Eng.* — 2007. — V. 15. — P. 424–428.
 19. *Talwalkar A., Kailasapathy K.* Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts // *Intern. Dairy J.* — 2004 — V. 14. — P. 143–149.
 20. *Демаков В. А., Максимова Ю. Г., Максимова А. Ю.* Иммунизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты // *Биотехнология.* — 2008. — № 2. — С. 30.
 21. *Tsen J. H., Chen H. H., King V. A.* Survival of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* immobilized in kappa-carrageenan gel // *J. Gen. Appl. Microbiol.* — 2002. — V. 48. — P. 237–241.
 22. *Desmond C., Ross R. P., O'Callaghan E. et al.* Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia // *J. Appl. Microbiol.* — 2002. — V. 93 — P. 1003–1011.
 23. *Шендеров Б. А.* Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. III: Пробиотики и функциональное питание. — М.: «ГРАНТЪ», 2001. — 288 с.
 24. *Шендеров Б. А.* Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. — М.: ДеЛи принт, 2008. — 319 с.

**СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ
ТЕХНОЛОГИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
ПРОБИОТИКОВ**

С. А. Старовойтова

Национальный университет
пищевых технологий, Киев

E-mail: svetik_2004@mail.ru

В работе освещены современные аспекты технологии иммобилизованных препаратов-пробиотиков и показаны преимущества иммобилизованных пробиотиков по сравнению с другими лекарственными формами бактериотерапевтических препаратов. Описаны основные методы и особенности иммобилизации пробиотических культур. Охарактеризованы основные материалы-носители, используемые в современной практике для иммобилизации пробиотических культур при создании новых пробиотиков. Рассмотрены вещества, которые в перспективе могут стать эффективными материалами-носителями при иммобилизации пробиотиков. Показано, что материалы-носители могут использоваться как отдельно, так и в комбинации друг с другом, что позволяет улучшать свойства готовых лекарственных форм иммобилизованных пробиотиков и увеличивать срок их пригодности. Дана характеристика современных иммобилизованных пробиотиков, представленных на рынке лекарственных препаратов Украины, и приведены их свойства. Проанализированы позитивные и негативные стороны некоторых иммобилизованных пробиотиков. Рассмотрены технологические аспекты получения иммобилизованного препарата и обоснован его компонентный состав.

Ключевые слова: технология, иммобилизация, адсорбция, пробиотики, пробиотические культуры, носитель, иммобилизованные пробиотики.

**MODERN ASPECTS
OF TECHNOLOGY OF IMMOBILIZED
PROBIOTICS**

S. O. Starovoitova

National University of Food Technologies, Kyiv

E-mail: svetik_2004@mail.ru

Modern aspects of technology of immobilized probiotics were illustrated. Advantages of immobilized probiotics in comparison with other drug forms of bacteriatherapeutic medication were pointed out. Principal methods and characteristics of immobilization of probiotic cultures were analyzed. Basic carrier materials used in modern practice for immobilization of probiotic cultures during creation of new probiotics were characterized. Substances, which could potentially be effective carrier materials for immobilization of probiotics were analyzed. It was shown that carrier materials could be used both separately and in combination with each other that improved properties of prepared medicinal forms of immobilized probiotics and let to increase their shelf life. The characteristic of modern immobilized probiotics of the Ukrainian medicines market is given and their properties are described. Positive and negative sides of some immobilized probiotics were analyzed. Technological aspects for receiving of immobilized preparation were considered and its component ingredients were proved.

Key words: technology, immobilization, adsorption, probiotics, probiotic cultures, carrier material, immobilized probiotics.