

Розділ 11

ЕПІЗООТОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ, МІКОЛОГІЯ, ІМУНОЛОГІЯ

УДК 619:615:619:579

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ РІДКОГО ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ 3 АЕРОКОКІВ

Бібен І.А., к.вет.н., доцент, bibenvet@ukr.net

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ

Анотація. Вивчено динаміку росту культури виробничого штаму *A. viridans* avium 21 на різних живильних середовищах та обрано оптимальне живильне середовище для одержання рідкої форми пробіотичного препарату. Експериментально доведена можливість конструювання рідких форм пробіотиків з урахуванням біохімічних аспектів метаболізму пробіотичних культур. На підставі отриманих даних розроблена принципова технологічна схема виробництва рідкої форми пробіотичного препарату.

Ключові слова: *A. viridans*, рідка форма пробіотику, живильне середовище, стимулятори росту.

Актуальність проблеми. 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].

Загальновізнана роль, що грають у підтримці здоров'ят варин та птиці аерококи та інші пробіотичні мікроорганізми [9, 10, 19]. Їхня життєдіяльність: регулює співвідношення мікробіоти макроорганізму; пригнічує активність гнильних і патогенних бактерій; стимулює продукування вітамінів; активізує імунні процеси; забезпечує захист від кишкових інфекцій; нормалізує функції кишечника; бере участь у засвоєнні живильних речовин, вітамінів і мікроелементів.

Останнім часом 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 і профілактики ряду захворювань.

На відміну від сухого, головна перевага рідкого про біотичного препарату полягає в тім, що бактерії в ньому перебувають у біологічно активній формі. Вони впливають корисно негайно - відразу після прийому препарату, що привабливо відрізняє його від аналогічних сухих препаратів. Крім живих бактерій рідкі про біотичні препарати містять продукти життєдіяльності корисних для макроорганізму біологічно активних речовин: незамінні амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни, стимулятори імунітету та вироблення 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 про біотику. Аерококи як мікроаерофіли, ростуть тільки за обмеженої кількості кисню, продукують активні форми кисню (АФК), що є аутоінгібіторами.

Конструювання живильного середовища [12], що враховує біохімічні аспекти метаболізму про біотичного мікроорганізму *A. viridians* avium 21, дозволило приступити до розробки технології виробництва рідкого про біотичного препарату

При конструюванні рідкого про біотику керувалися наступними принципами:

1. забезпечення стабільності властивостей про біотичного мікроорганізму;
2. функціональне структурування про біотику (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. viridians avium* 21A. 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 кліток аерококу здійснюється функціонуванням глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази, а також за допомогою хімічної реакції між пірвіноградною кислотою і водень пероксидом [9].

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

Матеріал та методи дослідження. Об'єкт дослідження - популяція виробничого штаму *A. viridians avium* 21, 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. viridians avium* 21 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.

В 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. viridians avium* 21 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 вирости 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 кліток.

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

Результати дослідження. У табл. 1 представлені результати досліджень характеру росту *A. viridians* на живильних середовищах із різними добавками.

Таблиця 1.

Ростові характеристики *A. viridians avium* 21 через 24 години росту при 37 °С

Найменування середовища	Концентрація мікробних кліток при висіві на МПА (КУО/мл; $M \pm m$)	
	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 вмістом 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% глюкоза, 0,001% цистеїн солянокислий, 1% альгінат натрію)

Як видно із даних таблиці найбільш інтенсивний ріст *A. viridans avium* 21 відзначається при вирощуванні в грибному бульйоні зі змістом амінного азоту 150 мг%.

Проведено дослідження впливу цистеїну солянокислого на накопичення живих кліток *A. viridans avium* 21 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 avium* 21

Вміст цистеїну солянокислого, мг/л	Концентрація <i>A. viridans avium</i> 21 у середовищі вирощування (КУО/мл; $M \pm m$)
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 табл. 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 (NH_2) – 150 мг %, глюкоза – 1%, цистеїн солянокислий – 100 мг/л.

Були вивчені властивості клітин *A. viridans avium* 21, що отримані на стандартних середовищах таі пропонованому середовищі культивування, для встановлення автентичності штаму мікроорганізму

Морфологічних відмінностей *A. viridans avium* 21 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 avium* 21 надані у табл.3.

Таблиця 3

Біохімічні властивості *A. viridans avium* 21, 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	-	-
Крахмал	+	+
Рафіноза	-	-
Інозит	-	-
Арабіноза	-	-
Сорбіт	-	-

Глюкоза (газ)	+	+
Желатіноза	-	-
Мальтоза	+	+
Дульцит	-	-
Аргінін	-	-
Лактоза	-	-
Глюкозний бульйон	Придонний ріст	Придонний ріст
Сольовий бульйон	-	-
Нітратний бульйон	-	-
Оксидна активність	+	+
Плазмокоагулаза	-	-

Умовні позначення: "+" - ферментація середовища, "-" - середовище не ферментується

Як видно із даних табл. 3, штами *A. viridans avium* 21, що вирощувалися на різних середовищах, ідентичні по своїм біохімічним властивостям. Перевірка антагоністичних властивостей двох штамів і відносини їх до антибактеріальних препаратів також не виявила відмінностей.

Висновки

1. Визначено оптимальне живильне середовище для одержання рідкої форми пробіотичного препарату.
2. Експериментально доведена можливість конструювання рідких форм пробіотиків із урахуванням біохімічних аспектів метаболізму - пробіотичних культур.
3. Розроблена принципова технологічна схема виробництва рідкої форми пробіотичного препарату.
4. Встановлена ідентичність культур *A. viridans avium* 21, що вирощені на різних живильних середовищах по морфологічним, біохімічним і антагоністичним властивостям, а також відношенням до антибактеріальних препаратів.

Література

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. Малик Н.И. Антилизозимные свойства молочно-кислых бактерий, выделенных из кишечника поросят и птицы /Малик Н.И. //Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов: Сб.науч.тр.- ВГНКИ.- М., 2001.- С. 98-99.
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., Щетініна В.М. Розробка живильного середовища для одержання біомаси *Staphylococcus aureus* // Аналі 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.
13. 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.
14. Риженко С.А., Черняев С.А., Кременчуцький С.Г. Зміна біологічних властивостей усередині популяції *Aerococcus viridans* // Мед. перспективи. – 2002. – Т.7, № 2. – С. 18-21.
15. Романов В.Е. Оценка возможности использования питательных основ и сред из непивцевого 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.
16. Технология сохранения жидких концентратов бифидобактерий и лактобацилл на основе стабилизированной активированной низкоминерализованной воды в метастабильном состоянии "МИС-РТ" - 2005 г. Сборник № 37-5. [Электронный ресурс]. <http://ikar.udm.ru/sb37-5.htm>.
17. FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. - 2002. [Электронный ресурс]. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
18. 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.
19. 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.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИДКОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ИЗ АЭРОКОККОВ

Бибен И.А., к.вет.н., доцент, bibenvet@ukr.net

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепропетровск

Аннотация. Изучена динамика роста культуры производственного штамма *A.viridans avium* 21 на различных питательных средах и избрана оптимальная питательная среда для получения жидкой формы пробиотического препарата. Экспериментально доказана возможность конструирования жидких форм пробиотиков с учетом биохимических аспектов метаболизма пробиотических культур. На основании полученных данных разработана принципиальная технологическая схема производства жидкой формы пробиотического препарата.

Ключевые слова: *A.viridans*, жидкая форма пробиотика, питательная среда, стимуляторы роста.

TECHNOLOGY FOR PRODUCING LIQUID PROBIOTIC PREPARATIONS FROM AEROCOCCUSES

Biben I.A., bibenvet@ukr.net

Dnepropetrovsk State Agrarian-economic University, Dnepropetrovsk

Summary. The dynamics of growth of culture of production culture of *A.viridans avium* 21 on different nourishing environments and an optimum nourishing environment is select for the receipt of liquid form of probiotics. Possibility of constructing of liquid forms of probiotics is experimentally well-proven taking into account the biochemical aspects of metabolism of probiotics cultures. On the basis of the received data the basic technological scheme of manufacture of the liquid form of a probiotic is develope.

Key words: *A.viridans*, liquid form of probiotics, nourishing environment, growth factors.