

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования**

**«Казанский (Приволжский) Федеральный университет»**

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра микробиологии

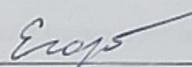
Направление подготовки: 06.03.01– биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ  
ЛАКТОБАЦИЛЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ  
НА МИНЕРАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЯХ**

Студент 4 курса  
группы 01-801

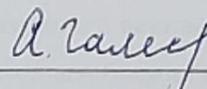
" " 2022 г.



(Егоров А.А.)

Научный руководитель  
к.в.н., ст. преподаватель

" " 2022 г.



(Галеева А.Г.)

Заведующий кафедрой  
микробиологии  
д.б.н., профессор

" " 2022 г.



(Ильинская О.Н.)

Казань – 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	7
1.1 Значение и функции микробиоты кишечника	7
1.2 Лактобактерии как основа пробиотических препаратов	8
1.3 Методы повышения устойчивости пробиотиков	11
1.4 Цеолиты в конструировании иммобилизованных форм пробиотиков	15
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	17
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	17
2.1 Микроорганизмы	17
2.2 Препараты	18
2.3 Питательные и защитные среды	18
2.4 Минеральные носители	18
2.5 Микробиологические методы	19
2.5.1 Культивирование лактобацилл	19
2.5.2 Иммобилизация лактобацилл на минеральных носителях	19
2.5.3 Определение сорбционной емкости носителей	20
2.5.4 Определение выживаемости лактобацилл	20
2.5.5 Определение кислотообразующей активности лактобацилл	21
2.5.6 Определение устойчивости лактобацилл к желудочно-кишечному стрессу	21
2.5.7 Определение антагонистической активности лактобацилл по отношению к условно-патогенной микрофлоре ЖКТ	22
2.6 Технологические методы	23
2.6.1 Лиофилизация иммобилизованных лактобацилл	23
2.7 Статистические методы	23

<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>24</b>
3.1 Определение оптимальных технологических приемов иммобилизации лактобацилл на поверхности цеолитов	24
3.2 Оценка влияния иммобилизации на стабильность лиофилизированных культур	26
3.3 Динамика сохранения пробиотических свойств иммобилизованных лактобацилл при долговременном хранении	30
3.3.1 Изменение кислотообразующей активности иммобилизованных лактобацилл	30
3.3.2 Изменение устойчивости иммобилизованных лактобацилл к желудочно-кишечному стрессу	32
3.3.3 Изменение антагонистической активности иммобилизованных лактобацилл	36
<b>4 ВЫВОДЫ</b>	<b>38</b>
<b>5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>40</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Для коррекции и восстановления состава кишечной микробиоты в клинической практике широко применяются пробиотики – непатогенные и нетоксигенные микроорганизмы, а также вещества природного происхождения, обеспечивающие при адекватном введении благоприятное воздействие на организм за счет повышения биологической активности нормальной микрофлоры [Ардатская с соавт., 2012]. Значительное количество пробиотических препаратов содержит в своем составе молочнокислые бактерии, которые составляют сопутствующую часть облигатной (индигенной) кишечной микрофлоры. На сегодняшний день номенклатура лактосодержащих пробиотиков на российском фармацевтическом рынке продолжает расширяться [Забокрицкий, 2015], однако традиционные формы выпуска зачастую не удовлетворяют современным требованиям промышленного производства пробиотиков [Несчисляев с соавт., 2015].

Помимо разработки более востребованных лекарственных форм, существенное значение имеет повышение эффективности пробиотических препаратов. Обеспечить последнее возможно посредством внедрения методических подходов, направленных на защиту бактериальных клеток при контакте с энтеральными средами [Савицкая с соавт., 2012]. Одним из способов повышения резистентности пробиотических микроорганизмов к энтеральным средам является конструирование препаратов на основе бактерий, иммобилизованных на различных сорбентах-носителях. Известно, что иммобилизованные клетки лучше сохраняют жизнеспособность в процессе сублимационной сушки, менее чувствительны к воздействию желудочно-кишечного стресса, а биологические свойства адекватно подобранного носителя позволяют усилить терапевтический потенциал пробиотического препарата [Столбова, 2018].

Исходя из этого, весьма актуальными и целесообразными представляются поиск и применение перспективных сорбентов-носителей в технологии изготовления пробиотических препаратов.

Целью настоящей работы явилось конструирование пробиотика на основе лактобацилл, иммобилизованных на минеральных носителях.

Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

- 1) Отработать оптимальные технологические приемы иммобилизации лактобацилл на поверхности цеолитов;
- 2) Определить влияние сорбентов на эффективность лиофилизации иммобилизованных лактобацилл;
- 3) Исследовать динамику изменения пробиотических свойств лиофилизатов лактобацилл при долговременном хранении.

## ВЫВОДЫ

1) В ходе исследований определены оптимальные технологические приемы иммобилизации лактобацилл на поверхности цеолитов с разной размерностью частиц. Необходимыми условиями для эффективной сорбции бактериальных клеток являются: использование динамического метода иммобилизации, массовая доля цеолитов в суспензии – не менее 2%, размер частиц – не более 40 мкм. Предложенный методический подход позволяет достичь полноты иммобилизации не менее 93%, что в количественном эквиваленте составляет не менее  $5.5 \times 10^9$  КОЕ на 1 г сорбента.

2) Доказано, что наличие сорбентов в образцах не снижает эффективности сублимационной сушки пробиотических культур. Был определен режим лиофилизации, позволяющий при использовании регламентированного лиопротектора обеспечить стартовую выживаемость большинства штаммов лактобацилл на уровне не менее 80% от исходного количества клеток. К концу срока хранения (8 месяцев) регистрировалась потеря в среднем до 10-13% живых клеток. Физические свойства полученных лиофилизированных образцов (внешний вид, макроструктура, время регидратации) были приближены к аналогичным параметрам коммерческого лактобактерина.

3) Установлено, что рассматриваемые штаммы лактобацилл после иммобилизации сохраняют необходимые пробиотические свойства: антагонистическую активность в отношении УПМ, устойчивость к желудочному и кишечному стрессам и способность к синтезу молочной кислоты. Использование минеральных носителей не влияет на пробиотические свойства лактобацилл; также статистически значимых отличий не выявлено между образцами, содержащими цеолит № 1 (размер частиц до 40 мкм) и цеолит № 2 (40 мкм). Зарегистрирован умеренный протективный эффект цеолитов при инкубации образцов в сублимированном желудочном соке: применение сорбентов увеличивает количество живых

бактериальных клеток в среднем на 1 порядок спустя 2 часа инкубации по сравнению с образцами, не содержащими сорбент.

Наилучшими пробиотическими характеристиками обладают штаммы *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, что в совокупности позволяет рассматривать их в качестве перспективных культур для включения в состав пробиотических препаратов на основе минеральных носителей.