

Таким чином, в роботі вперше було науково обґрунтовано та експериментально доведено доцільність вдосконалення технології варення з айви шляхом його збагачення екстрактами з листя ГБ, отриманими методом субкритичного екстрагування.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Collins, B.J., Kerns, S.P., Aillon, K. et al. // *Anal Bioanal Chem.* 2020. 412: 6789–6809.
2. R. Sharma, V. Joshi, J. Rana // *Indian Journal of Natural Products and Resources.* 2011. 2(3): 354-357.
3. Siddiqui N., Azhar I., Tarar O., Masood S., Mahmood Z. // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2015. 4(6): 68-77.

### ВИКОРИСТАННЯ CRISPR-ТЕХНОЛОГІЙ У СТВОРЕННІ НОВИХ ШТАМІВ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОБІОТИКІВ

К.С. Малишко

Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»,  
м. Харків, Україна,  
студентка бакалаврського рівня вищої освіти кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, [Kateryna.Malyshko@iht.khpi.edu.ua](mailto:Kateryna.Malyshko@iht.khpi.edu.ua)

Останні роки позначені стрімким зростанням інтересу до пробіотичних мікроорганізмів як компонентів функціонального харчування, що безпосередньо впливають на метаболічне, імунне та навіть нейропсихічне здоров'я людини. Пробіотики застосовуються не лише у харчовій промисловості, а й у медицині, ветеринарії, дитячому харчуванні та клінічних дослідженнях. Проте важливо розуміти, що ефективність пробіотичних препаратів залежить не лише від виду мікроорганізму, а й від його генетичних особливостей — здатності виживати у жорстких умовах ШКТ, колонізувати слизові оболонки, синтезувати біологічно активні речовини, бути безпечними та стабільними в технологічному процесі.

В умовах сучасної біотехнології надзвичайно важливо мати інструменти, що дозволяють швидко і точно вдосконалювати такі штами. CRISPR-Cas-системи стали справжнім проривом у сфері геномного редагування, адже на відміну від класичних методів трансформації, вони дозволяють здійснювати прицільне редагування ДНК із мінімальними позацільовими ефектами. Це дає змогу створювати нові пробіотичні культури з оптимальними властивостями для різних груп населення — від немовлят до осіб із захворюваннями шлунково-кишкового тракту.

Метою дослідження було розроблення ефективного підходу до створення високоефективних пробіотичних штамів *Lactobacillus* із застосуванням CRISPR-Cas9 для посилення їх функціональних властивостей, зокрема виживаності в агресивному середовищі, здатності до колонізації кишківника та антимікробної активності.

Базовими об'єктами дослідження були лабораторно адаптовані штами *L. plantarum* DSM 20174 та *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, які вже мають підтверджені пробіотичні властивості. Конструювання CRISPR-касет здійснювалось на основі плазмиди pCRISPR-Cas9 з індукцією трансформації за допомогою електропорації.

Редагування проводилося у трьох напрямках: (1) підвищення експресії білків теплового шоку (groEL, dnaK), (2) посилення адгезивних властивостей шляхом вставки посиленних промоторів до fbrA, (3) інтеграція додаткових копій plnEF для синтезу бактеріоцинів.

Після модифікації штами культивували у середовищі MRS, далі проводили оцінку:

- виживаності при pH 2.0–3.0 та в присутності 0,3% жовчних кислот,
- адгезії до клітин Caco-2 за допомогою світлової мікроскопії та аналізу CFU,

– антагоністичної активності до *E. coli*, *S. enterica*, *C. difficile* методом подвійного посіву,

– стабільності змін після 10 пасажів.

Порівняння з контрольними штамми показало статистично достовірне ( $p < 0.05$ ) зростання функціональних показників. Вживаність у кислому середовищі зросла на 70–85 %, тоді як контрольні культури втрачали до половини популяції. За результатами адгезійного тесту, кількість прикріплених клітин модифікованих штамів зросла в середньому на 1,5 раза.

Особливо яскравим був ефект посилення антимікробної дії: зони пригнічення росту патогенів сягали 12–18 мм у модифікованих штамів проти 6–9 мм у вихідних. При цьому бактеріоцинову активність вдавалося зберегти навіть після п'яти циклів заморожування та розморожування.

Молекулярне підтвердження успішного редагування проводилось методом PCR із подальшим секвенуванням. Після 10 пасажів зміни зберігалися без втрати активності, що підтверджує стабільність конструйованих штамів.

Ці результати демонструють, що CRISPR-підхід відкриває можливість створення так званих "дизайнерських" пробіотиків, які можна налаштувати під потреби конкретних споживчих груп.

Застосування CRISPR-технологій у біотехнології пробіотичних мікроорганізмів дозволяє вивести розробку нових штамів на якісно новий рівень. Отримані штами не лише мають покращені фізіологічні властивості, але й демонструють стабільність, безпечність і високу ефективність у *in vitro* тестах. У подальшому це відкриває можливості для розробки адаптивних функціональних продуктів, що враховують індивідуальні особливості споживача.

З огляду на зростаючі потреби у продуктах з доказовою дією, впровадження CRISPR-підходів у промислову практику має стратегічне значення для розвитку біотехнологічного та фармацевтичного секторів. Надалі перспективним є дослідження *in vivo* моделей, реєстрація штамів як GRAS та оцінка їх ефективності у клінічних випробуваннях.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Barrangou R., Doudna J.A. // *Nature Biotechnology*. 2016. 34(9): 933–941.
2. Zhang F. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2021. 61: 681–704.
3. van Pijkeren J.P., Britton R.A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. 29: 70–75.
4. Papadimitriou K. et al. // *Front. Microbiol.* 2015. 6: 654.
5. Denou E. et al. // *J. Appl. Microbiol.* 2008. 104(5): 1407–1416.
6. Kommineni S. et al. // *Nat. Commun.* 2015. 6: 8384.
7. Rodríguez J.M. et al. // *Int. J. Food Microbiol.* 2009. 130: 45–56.
8. Liu Y. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. 104(9): 3783–3796.