

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Столбова Мария Георгиевна

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРОБИОТИКОВ
НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Несчисляев В.А.

Пермь – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Значение и функции микробиоты человека	11
1.2 Бифидо- и лактобактерии как основа пробиотиков.....	14
1.3 Иммобилизация как метод повышения устойчивости пробиотиков.....	22
1.4 Технологические аспекты производства пробиотиков	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1 Микроорганизмы.....	37
2.2 Препараты	38
2.3 Питательные и защитные среды.....	39
2.4 Сорбенты	39
2.5 Материалы для изготовления капсулированной лекарственной формы препарата.....	40
2.6 Физико-химические методы.....	41
2.7 Микробиологические методы	43
2.8 Технологические методы.....	48
2.9 Статистические методы	50
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА И ЭФФЕКТОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ	51
3.1 Изучение технологических свойств носителей и биологических параметров иммобилизации клеток	51
3.2 Исследование устойчивости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий к действию кислого раствора пепсина	56
3.3 Влияние иммобилизации на стабильность лиофилизированных культур	58

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУХОЙ БИОМАССЫ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ.....	65
4.1 Оценка физико-химических и биологических свойств сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий.....	65
4.1.1 Исследование выживаемости иммобилизованных клеток в условиях <i>in vitro</i> , имитирующих процесс пищеварения у человека	71
4.1.2 Исследование антагонистической активности иммобилизованных бифидо- и лактобактерий	75
4.2 Оценка технологических свойств сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий.....	80
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КАПСУЛИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИФИДОБАКТЕРИЙ.....	83
5.1 Выбор вспомогательных веществ, обеспечивающих необходимые технологические свойства порошка для наполнения ТЖК.....	83
5.2 Обоснование выбора типоразмера капсул, получение экспериментальных образцов и оценка их стабильности в процессе хранения.....	87
5.3 Получение экспериментально-производственных серий препарата «Имбикапс» и контроль в процессе хранения.....	93
5.4 Определение специфической активности иммобилизованных бифидобактерий и препарата «Имбикапс»	97
5.5 Технологическая схема производства капсулированной лекарственной формы пробиотика «Имбикапс».....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	142
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	144
Приложение А. Нормативная документация на препарат «Имбикапс».....	145
Приложение Б. Акты внедрения.....	149

ВВЕДЕНИЕ

Негативное воздействие окружающей среды, несбалансированное питание, нерациональное применение антибактериальных препаратов, жизнь в условиях хронического стресса, болезни различной этиологии и многие другие факторы, сопровождающие современного человека в течение всей его жизни, приводят к серьезным нарушениям его микробиоты, чаще всего в виде кишечного дисбиоза различной степени тяжести. Поддержание и восстановление микрoэкологического статуса, как одного из определяющих условий здоровья всего организма, является актуальной задачей здравоохранения [55, 99, 159].

Накопленный объем данных о функционировании микробиоценозов организма человека позволяет рассматривать препараты, содержащие живые микроорганизмы и вещества микробного (пробиотики) или иного (пребиотики) происхождения, стимулирующие рост и активность облигатной микрофлоры, как ключевые инструменты влияния на здоровье человека в плане лечения и профилактики широкого спектра инфекционных, метаболических, иммуноопосредованных и иных заболеваний. В настоящее время средства, регулирующие равновесие кишечной микробиоты, весьма разнообразны и их номенклатура продолжает активно расширяться [58, 62, 63, 147].

Традиционный выпуск пробиотиков в виде сухой биомассы во флаконах не отвечает современным требованиям рынка лекарственных средств. Улучшение потребительских свойств отечественных пробиотических препаратов связано с производством этих препаратов в виде капсул и дозированных порошков [111]. Такие лекарственные формы приняты в настоящее время для многих зарубежных пробиотиков. Помимо более востребованной лекарственной формы, большую значимость имеет повышение эффективности пробиотика, которое достигается при использовании технологических приемов, направленных на защиту клеток при прохождении через верхние отделы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека, поскольку известно, что желудочный сок и желчь обладают

бактерицидным действием и служат факторами неспецифической антибактериальной защиты организма [110, 165, 200].

Конструирование препаратов с иммобилизованными на различных сорбентах пробиотическими бактериями можно рассматривать как один из способов повышения их резистентности к энтеральным средам [23, 34, 89, 115]. Иммобилизованные клетки – такие клетки, для которых созданы искусственные ограничения подвижности во внешней среде. Связанное состояние в виде фиксированных к различным поверхностям микроколоний является естественной формой существования в природе любых микроорганизмов [68]. Использование иммобилизации бактерий предполагает достижение технологического и терапевтического эффектов. Адсорбированные клетки, как правило, более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов. Они лучше сохраняют жизнеспособность при лиофилизации, в процессе технологических манипуляций с сухой биомассой, при хранении препарата. Иммобилизованные бактерии менее чувствительны к воздействию желудочного сока и желчи. Кроме того, биологическая активность сорбента позволяет дополнить спектр терапевтического действия пробиотика [18, 151].

К настоящему времени на российском фармацевтическом рынке представлены сорбированные на косточковом активированном угле препараты «Бифидумбактерин форте» и «Пробифор» (иммобилизованные бифидобактерии), «Флорин форте» (иммобилизованные бифидо- и лактобактерии), которые широко применяются в лечебной практике. Применение иммобилизованных пробиотиков способствует наступлению быстрого клинического эффекта и более раннему восстановлению нарушенного микробиоценоза [165, 182, 185].

Фармацевтический рынок России постоянно пополняется новыми энтеросорбентами, которые могут быть использованы в разработке иммобилизованных пробиотиков [20, 70, 153, 181].

Вышеуказанное свидетельствует о целесообразности и актуальности поиска и применения новых перспективных сорбентов в технологии различных лекарственных форм пробиотических препаратов.

Степень разработанности темы диссертации. Исследования В. А. Несчислаева [111, 115] в сфере изучения свойств и разработки технологии адсорбированных пробиотиков в значительной мере способствовали развитию направления по созданию препаратов на основе иммобилизованных клеток.

Цель работы:

Разработка состава и технологии лекарственных форм пробиотиков на основе иммобилизованных бифидо- и лактобактерий с использованием органических сорбентов природного происхождения.

Задачи:

1. Отработать оптимальные технологические приемы иммобилизации пробиотических клеток и провести сравнительное изучение протективных свойств сорбентов: гомогенат бурых водорослей (фукус, ламинария), альгинат натрия, клетчатка, отруби пшеничные ферментированные, лигнин гидролизный (полифепан), семена льна, крахмал прежелатинизированный, микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ).

2. Определить влияние сорбентов на эффективность сублимационного высушивания иммобилизованной биомассы клеток и исследовать биологические и технологические свойства лиофилизатов бифидо- и лактобактерий – основного компонента лекарственных форм (лиофилизат во флаконе, капсулы) пробиотиков.

3. Модифицировать технологические свойства лиофилизатов иммобилизованной биомассы клеток для получения капсулированной лекарственной формы пробиотиков.

4. Разработать состав и технологию капсулированного пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий, изучить его качественные характеристики и сохраняемость, подготовить нормативную документацию (НД).

Научная новизна. Впервые апробирован и реализован комплексный подход к созданию пробиотиков на основе иммобилизованных клеток, включающий новую совокупность микробиологических и технологических приемов конструирования, изготовления и стандартизации капсулированного препарата.

Изучено влияние группы органических сорбентов природного происхождения, ранее не применявшихся в производстве пробиотических препаратов, на биологические и технологические свойства клеточной биомассы.

В сравнительных исследованиях выявлен выраженный протективный эффект сорбентов на основе бурых водорослей (ламинария, фукус), характеризующийся повышенной защитой клеток от бактерицидного воздействия пищеварительных соков и, соответственно, более высоким уровнем выживаемости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий при прохождении ЖКТ.

Предложен вариант адаптации технологических свойств лиофилизированной биомассы иммобилизованных бифидобактерий для получения капсулированной формы пробиотика.

Практическая значимость работы заключается в расширении арсенала пробиотических препаратов, предназначенных для коррекции дисбиозов, и технологических новациях в сфере производства пробиотиков. Изучено влияние различных сорбентов на специфическую активность, устойчивость к действию биологических жидкостей и физические свойства (гигроскопичность, сыпучесть, насыпная плотность) лиофилизированной биомассы бифидо- и лактобактерий – основного компонента лекарственных форм (сухая биомасса во флаконе, капсулы) пробиотиков.

Определены вспомогательные вещества для лиофилизата бифидобактерий, позволяющие получать однородный порошок с удовлетворительными показателями сыпучести и гигроскопичности и насыпной плотности для дозирования в капсулы.

Разработан состав и способ получения капсулированного пробиотического препарата «Имбикапс» на основе бифидобактерий, иммобилизованных на гомогенате бурых водорослей. Определены необходимые параметры специфической активности разработанного пробиотика и предложены методы их контроля. Подготовлен и утвержден пакет НД на производство данного препарата, получено свидетельство о государственной регистрации.

Материалы диссертационной работы используются в качестве лекционного материала и при проведении семинаров по теме «Пробиотики» на кафедре промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии.

Материалы диссертации могут служить методической основой в сфере разработок иммобилизованных пробиотиков. Представленная технология получения сухой биомассы на основе иммобилизованных клеток может быть применена для любого производственного пробиотического штамма бифидо- и лактобактерий с последующим конструированием лекарственной формы препарата на ее основе.

Методология и методы исследования. Методологическая основа исследования связана с известными трудами отечественных ученых в сфере создания высокоэффективных пробиотиков и оригинальных технологических решений для изготовления их лекарственных форм. В настоящем диссертационном исследовании были использованы физико-химические, микробиологические, технологические, аналитические и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения иммобилизованных бифидо- и лактобактерий для создания пробиотических препаратов.

2. Характеристика протективных свойств сорбентов в отношении производственных штаммов бифидо- и лактобактерий в моделируемых условиях ЖКТ и при лиофилизации.

3. Получение лиофилизатов иммобилизованных бифидо- и лактобактерий с технологическими и биологическими свойствами, пригодными для организации производственного выпуска капсулированной лекарственной формы пробиотиков.

4. Состав, технология и биологические свойства капсулированного пробиотика «Имбикапс» на основе иммобилизованных бифидобактерий.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Научные положения и заключение, сформулированные в диссертации, базируются на большом объеме проведенных экспериментальных исследований, выполненных с

использованием современных методов анализа и последующей статистической обработкой результатов исследования.

Основные результаты работы доложены на Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, ноябрь 2010); 13 Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2011» (Санкт-Петербург, май 2011); XIII региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых (Пермь, апрель 2011); межвузовской научной конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА (Пермь, апрель 2012); 17-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2015» (Санкт-Петербург, май 2015), Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (Пермь, июнь 2018).

Публикации. По материалам исследования опубликовано 11 работ (из них 2 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (№ 01.9.50007417).

Личный вклад автора. Данные, приведенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора на всех этапах планирования и проведения экспериментальных исследований на базе ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России и в филиале АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Исследования, представленные в диссертации, соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств, пункту 3 – Разработка технологий получения субстанции и готовых лекарственных форм, и пункту 4 – Исследования по изучению особенностей технологии получения готовых

лекарственных форм из различных видов субстанций, сырья и вспомогательных веществ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 27 таблиц и 8 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав экспериментальных исследований, заключения, списка литературы, включающего 255 источников, из них 189 отечественных и 66 иностранных авторов, приложений на 6 с.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Значение и функции микробиоты человека

Человек – это сложная микрoэкологическая система, предполагающая состояние динамического равновесия, которое определяется, с одной стороны, физиологическими и иммунологическими особенностями макроорганизма, а с другой – количественным и качественным составом микробных ассоциаций и разнообразием их биологической активности. В процессе эволюции сложилась определенная интеграция и специализация их функций, которая позволяет рассматривать микробиоту здорового человека как единое целое, как отдельный полноценный орган, согласованно работающий в интересах всей системы организма хозяина [5, 15, 22, 103, 218].

Микробиота кишечника (совокупность микроорганизмов, населяющих кишечник человека) выполняет ряд важных функций в жизнедеятельности человеческого организма: защитную, пищеварительную, метаболическую и иммуномодулирующую [32, 81, 167, 187]. Защитная функция микробиоты кишечника заключается в предохранении пищеварительного тракта от колонизации патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Это связано с механизмом колонизационной резистентности макроорганизма, включающей антагонистические взаимоотношения между облигатной микрофлорой (в основном бифидо- и лактобактериями) и условно-патогенными микроорганизмами, грибами, дрожжами. Реализация колонизационной резистентности обеспечивается за счет адгезии клеток нормофлоры к эпителиоцитам кишечника и образования на его поверхности плотной биопленки, препятствующей колонизации слизистой патогенными и условно-патогенными микроорганизмами [13, 64, 231].

Защитная функция микробиоты реализуется также за счет образования бактериостатических низкомолекулярных метаболитов, деградации бактериальных токсинов, деконъюгации желчных кислот, продукции широкого спектра антимикробных веществ – бактерицинов [25, 79, 134]. К продуктам жизнедеятельности облигатной микрофлоры кишечника также относятся уксусная, молочная, янтарная кислоты, создающие в кишечнике кислую среду, задерживающую развитие патогенной микрофлоры [15, 169].

Пищеварительная функция включает в себя синтез микроорганизмами целого ряда ферментов, обеспечивающих расщепление некрахмальных полисахаридов и пищевых волокон, а также завершающих гидролиз жиров. Деконъюгация желчных кислот микроорганизмами определяет гипохолестеринемический эффект микробиоты [30, 55, 79, 103].

Метаболическая функция нормальной микрофлоры заключается в синтезе витаминов группы В, биотина, витамина К, аминокислот (аргинин, глутамин); в метаболизации экзо- и эндотоксинов [79]. Детоксикация идет как по механизму микробной биотрансформации токсинов с образованием конечных нетоксичных продуктов, так и по механизму энтеросорбции. Как своеобразный биоэнтеросорбент, микробные клетки способны аккумулировать различные токсические продукты и ксенобиотики с последующим выведением их из организма. Детоксикация канцерогенов, мутагенов и других онкогенов обуславливает противоопухолевую активность нормальной микрофлоры [30, 178].

Метаболическая функция осуществляется также за счет синтеза короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), играющих важную энергетическую и регуляторную роль в здоровом организме, а также участвующих в патофизиологии ряда заболеваний не только ЖКТ, но и других органов и систем. КЦЖК могут использоваться клетками человека в качестве источников энергии в процессе окислительного фосфорилирования. В частности, масляная кислота может обеспечивать 60–70 % энергетических потребностей колоноцитов. Значительная часть КЦЖК по воротной системе достигают печени, где метаболизируются до глюкозы. Пропионат преимущественно участвует в

глюконеогенезе, в регуляции углеводного и липидного обмена, а ацетат – в липогенезе и является важным энергетическим субстратом для сердца, мозга, почек, мышц и других тканей [107, 169, 174].

Естественная аутофлора кишечника тормозит процессы декарбоксилирования пищевого гистидина, уменьшая тем самым синтез гистамина и, следовательно, снижает риск пищевой аллергии [79].

Бактерии нормофлоры участвуют в обмене микроэлементов, способствуют лучшему усвоению и всасыванию железа, кальция, витамина D, то есть оказывают антианемическое и антирахитическое действие [30, 178].

Иммуномодулирующая функция микробиоты осуществляется как по отношению к неспецифическим факторам защиты, так и собственно адаптивному иммунному ответу. За счет микробиоты происходит запуск и последующая активация синтеза неспецифических факторов защиты как гуморальных (лизозим, пропердин, комплемент), так и клеточных (фагоцитоз). Воздействие на иммунитет включает в себя стимуляцию созревания лимфоидного аппарата кишечника, активацию синтеза sIgA и стимуляцию продукции цитокинов и интерферонов колоноцитами [79, 82, 139, 176, 220].

Микробиота участвует в обеспечении и контроле моторной активности кишечника посредством продукции КЦЖК. В проксимальном отделе толстой кишки КЦЖК стимулируют рецепторы L-клеток, вырабатывающих регуляторный пептид, замедляющий моторику толстой и тонкой кишки. В дистальных отделах толстой кишки эффект КЦЖК противоположный. Они стимулируют рецепторы Ecl-клеток, вырабатывающих гистамин, который действует на рецепторы блуждающего нерва, инициирующих рефлекторное ускорение пассажа кишечного содержимого [79, 103, 183].

Таким образом, функциональные возможности микробиоты кишечника сопоставимы с деятельностью целого органа. Нарушение одной из функций приводит к возникновению дефицита микронутриентов, снижению иммунного статуса, что вызывает патологические процессы в органах и системах макроорганизма [179]. Этот факт дал основание говорить о микробиоте как о

полноправном метаболическом органе, принимающем участие в поддержании здоровья и развитии различных заболеваний. Учитывая ключевую роль симбиотической микробиоты (в первую очередь микробиоты кишечника) в обеспечении гомеостаза не только ЖКТ, но и организма в целом, сегодня многие ведущие исследователи рассматривают организм человека как некий «сверхорганизм», совокупный геном которого представлен его собственным геномом и микробиомом – коллективным геномом населяющих его микроорганизмов. Согласно данным представлениям большинство структурно-функциональных изменений (болезней внутренних органов) является следствием нарушения взаимоотношений организма человека и его микробиоты [33, 92, 144, 156, 157].

1.2 Бифидо- и лактобактерии как основа пробиотиков

Состояние динамического равновесия между организмом хозяина, микроорганизмами, его заселяющими, и окружающей средой, при котором здоровье человека находится на оптимальном уровне, принято называть эубиозом [65, 186]. В настоящее время отмечается неуклонный рост заболеваний, связанных с нарушением биологического равновесия между макроорганизмом, то есть человеком, и разнообразными популяциями микробной флоры его отдельных органов и систем. Дисбактериоз кишечника выявляется у 75–90 % больных с острыми и хроническими гастроэнтерологическими заболеваниями и практически у всех пациентов с острыми кишечными инфекциями. Являясь вторичной патологией, дисбактериоз кишечника усугубляет тяжесть и ухудшает прогноз течения основного процесса, а успешное устранение дисбиотических нарушений улучшает результаты лечения первичного заболевания [15, 28, 146, 172].

Согласно нормативному документу, посвященному проблемам кишечного дисбактериоза (отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004–2003)) под дисбактериозом кишечника

понимают клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава микрофлоры кишечника с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений с возможным развитием желудочно-кишечных расстройств. В настоящее время используется более широкое понятие «дисбиоз», включающее в себя не только наличие изменений со стороны бактериального пула микроорганизмов, но и вирусов, простейших, грибов, а также учитываются метаболитные сдвиги в состоянии макроорганизма, специфика нарушений состава микробиоты в разных биотопах организма человека [103, 104, 173]. По мнению Я. С. Циммермана [172] дисбиоз – это такое состояние экосистемы, когда наблюдается нарушение функций всех ее компонентов: макроорганизма, его резидентной микрофлоры и среды ее обитания, а также механизмов их взаимодействия. Согласно последним представлениям в основе многих хронических заболеваний человека лежат нарушения микробного метаболизма, приводящие к развитию метаболического дисбиоза, который проявляется, прежде всего, метаболическими изменениями (в сыворотке крови, моче, кале, выдыхаемом воздухе) и не всегда сопровождается значимыми изменениями качественного и/или количественного состава микробиоты [100, 143, 144, 145, 158, 159].

К наиболее значимым факторам, приводящим к нарушению микробиоценоза кишечника, можно отнести: ятрогенные воздействия (применение антибиотиков, гормонов, цитостатиков, лучевая терапия, оперативные вмешательства); фактор питания (дефицит пищевых волокон, потребление пищи, содержащей антибактериальные компоненты, консерванты, красители, несбалансированное и нерегулярное питание); стрессы различного генеза; острые инфекционные заболевания ЖКТ; снижение иммунного статуса различного генеза; заболевания внутренних органов, прежде всего органов ЖКТ; функциональные нарушения моторики кишечника [11, 30, 103, 109].

Проблема дисбиотических нарушений микробиоценозов различных биотопов организма человека в настоящее время является весьма актуальной и требует практических решений. Современные принципы лечебной коррекции

дисбиотических сдвигов и восстановления эубиоза включают широкий спектр мероприятий. Во-первых, это патогенетическое лечение основной патологии и, при необходимости, селективная деконтаминация патогенной и условно-патогенной микрофлоры. В дальнейшем (или параллельно) проводят восстановление нормальной микрофлоры, включающее применение средств коррекции нарушений микробиоценоза. Результаты многочисленных экспериментальных исследований и накопленный клинический опыт свидетельствуют об эффективности применения пробиотиков с лечебной и профилактической целью. Пробиотики – это живые микроорганизмы и/или вещества микробного или иного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятное воздействие на физиологические и биохимические функции организма путем оптимизации его микроэкологического статуса [41, 103, 124, 255].

К механизмам положительного действия пробиотиков на макроорганизм относятся: подавление патогенной и избыточной условно-патогенной флоры, стимуляция индигенной флоры, модуляция иммунной системы макроорганизма, противоаллергическое и антиканцерогенное действие [9, 26, 138, 161, 162, 163].

В современной отечественной и зарубежной литературе кроме термина «пробиотики» общеупотребимыми являются следующие определения препаратов из этой группы: пребиотики – препараты немикробного происхождения, стимулирующие рост облигатных микроорганизмов, синбиотики – содержат живые микроорганизмы и пребиотики, симбиотики – содержат комбинацию из нескольких видов живых микроорганизмов, пробиотические комплексы, представляющие собой комбинацию из перечисленных выше компонентов и средств из других групп (сорбентов, витаминов, микроэлементов) [29, 103, 121, 147].

Долговременное применение пробиотиков, оценка их эффективности и безопасности позволили выработать ряд требований, которым они должны соответствовать: 1) содержать микроорганизмы или продукты их метаболизма, пробиотический эффект которых доказан; 2) обладать стабильной клинической

эффективностью; 3) быть непатогенными и нетоксичными; 4) оказывать положительное влияние на организм человека, подтвержденное клиническими наблюдениями; 5) обладать колонизационным потенциалом – способностью к выживанию и жизнедеятельности в условиях кишечного микроокружения, например микроорганизм должен быть устойчив к низким значениям pH в желудке, к воздействию желчи); 6) быть стабильными и сохранять жизнеспособность бактерий при длительном сроке хранения. Специальные требования предъявляются и к штаммам бактерий, на основе которых создаются препараты [12, 15, 141].

Результаты фундаментальных исследований и анализ изменений микробиоты толстой кишки позволяет сделать вывод, что одним из более распространенных и значимых нарушений кишечного микробиоценоза является недостаточность бактерий нормофлоры, в первую очередь – бифидобактерий и лактобактерий, которые присутствуют в кишечнике на протяжении всей жизни здорового человека и играют существенную роль в обеспечении состояния физиологической нормы. Отсутствие и уменьшение содержания бифидо- и/или лактобактерий ниже нормального уровня является одним из патогенетических факторов дисфункции кишечника и нарушений физиологической деятельности многих органов и систем. Уровень бифидо- и лактобактерий в кишечнике может служить индикатором микрoэкологического статуса организма. Выявлена корреляция между содержанием этих нормальных симбионтов в аутофлоре и резистентностью макроорганизма к инфекции [15, 16].

Бифидобактерии – это облигатно-анаэробные грамположительные неспорообразующие палочки с раздвоенными концами, относятся к роду *Bifidobacterium*. Из кишечника здоровых людей чаще других выделяются и считаются наиболее физиологическими для организма человека 5 видов, а именно: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve* и *B. adolescentis* [12, 91, 180].

Бифидобактерии заселяют ЖКТ человека с первых дней жизни, а в составе нормальной микробиоты здоровых взрослых присутствуют постоянно. В кишечнике они обнаруживаются в разных количествах: в двенадцатиперстной

кишке – до 10^4 клеток в 1 мл, в дистальном отделе тонкой кишки – до 10^8 клеток в 1 мл, а в разных отделах толстой кишки примерно одинаково – до 10^{10} – 10^{11} клеток в 1 мл. Видовой состав бифидофлоры человека неодинаков и претерпевает изменения в зависимости от возраста, характера питания и ряда других физиологических особенностей. Элиминация или значительное снижение их количества в ЖКТ ведут к глубоким нарушениям процессов пищеварения и всех видов обмена. На фоне дефицита бифидофлоры наиболее активно проявляются патогенные свойства стафилококка, протеев, грибов рода *Candida* [12, 15, 24].

Физиологическая роль бифидобактерий многопланова: нормализация и стабилизация микробиоценоза, формирование колонизационной резистентности кишечника; улучшение процессов всасывания, участие в белковом, липидном и минеральном обменах; синтез аминокислот, белков и витаминов; поддержание неспецифической резистентности организма, стимуляция противоинфекционного иммунного ответа [12, 21, 56, 119]. О. В. Бухарин с соавт. [31], исследуя механизмы функционирования нормального микросимбиоза, показал, что метаболиты *B. bifidum* в 50 % случаев и более стимулировали или не изменяли биологические свойства микроорганизмов, характерных для эубиоза кишечника, в том числе бактерий своего вида, что может иметь значение при реализации бифидобактериями колонизационной резистентности биотопа. Данные изменения были характерны для таких биологических свойств, как рост/размножение, биопленкообразование и антилизоцимная активность, способствующих выживанию (персистенции) и адаптации микросимбионтов в организме хозяина.

Широкий спектр благотворного воздействия на макроорганизм позволяет рассматривать бифидобактерии как эффективный биокорректор и основу для создания препаратов и продуктов, обладающих многофакторным регулирующим и стимулирующим воздействием на организм [5, 164].

Не менее значимым компонентом нормальной микрофлоры человека являются бактерии рода *Lactobacillus* – грамположительные полиморфные аспорогенные палочки. Наиболее типичные виды: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei* [12, 24].

Лактобактерии колонизируют ЖКТ человека с первых дней жизни и затем сопутствуют человеку всю жизнь. В разных отделах пищеварительной системы они обнаруживаются в неодинаковых количествах: в ротовой полости и желудке 10^2 – 10^3 клеток в 1 мл, в тощей кишке – 10^2 – 10^4 клеток. В нижних отделах лактофлора уступает строгим анаэробам – бифидобактериям и бактероидам. Хотя лактобактерии составляют меньшую часть флоры кишечника, их метаболические функции делают особенно значимой эту популяцию [49, 60, 65].

Участие лактобактерий в физиологических процессах, обеспечивающих здоровье человека, многогранно. Присутствуя практически во всех отделах ЖКТ, лактобактерии вступают в сложные взаимодействия с другими микроорганизмами, что проявляется в подавлении роста и размножения условно-патогенной флоры. Лактобактерии блокируют рецепторы клеток слизистой оболочки кишечника от адгезинов патогенных микробов, т.е. обеспечивают его колонизационную резистентность. Они разлагают углеводы с образованием большого количества молочной кислоты, продуцируют лизоцим, бактериоцины и бактериоциноподобные вещества, оказывающие непосредственное действие на микроорганизмы. Лактобактерии, как и бифидобактерии, обладают выраженной иммуномодулирующей активностью [12, 60, 65, 117, 118]. Преимущества лактосодержащих пробиотиков по сравнению с бифидосодержащими обусловлены тем, что некоторые штаммы лактобактерий обладают высокой устойчивостью к разрушающему действию желудочного сока, желчных кислот и панкреатических ферментов [122, 183]. В последние годы вызывает интерес способность отдельных кислоторезистентных штаммов лактобактерий подавлять размножение и препятствовать адгезии *Helicobacter pylori*, способствуя элиминации данных микроорганизмов [8, 88, 171].

К настоящему времени опубликовано большое количество экспериментальных данных и клинических наблюдений о выраженной профилактической и терапевтической эффективности пробиотиков на основе компонентов нормальной микрофлоры кишечника. Пробиотические препараты назначаются детям и взрослым при коррекции и профилактике дисбиозов

различной этиологии, при лечении острых кишечных инфекций, хронических заболеваний ЖКТ с выраженными дисбиотическими явлениями, воспалительных заболеваний кишечника (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона) и т.д. [3, 10, 58, 130, 147].

В зависимости от состава, препараты, нормализующие кишечную микрофлору, подразделяют на следующие группы [55, 90, 131]:

1. Монокомпонентные – содержат один штамм бактерий («Бифидумбактерин», «Лактобактерин»);

2. Поликомпонентные – содержат два и более штамма бактерий-пробиотиков («Бифилонг», «Линекс», «Бифиформ», «Бификол»);

3. Комбинированные – содержат комплекс бактерий с каким-либо веществом немикробного происхождения («Бифилиз» – сочетание *B. bifidum* и лизоцима);

4. Имобилизованные (сорбированные) – группа пробиотиков, представляющая собой бактерии, фиксированные на сорбенте («Бифидумбактерин форте», «Пробифор», «Флорин-форте», «Экофлор»).

5. Метаболитные – в состав входят не сами микроорганизмы, а продукты их жизнедеятельности («Хилак форте»). К данной группе препаратов относится метабиотик «Микростим», разработанный в филиале АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» [175].

Важным критерием эффективности пробиотика является устойчивость микроорганизмов к действию желудочного сока, желчных кислот и панкреатических ферментов, что обеспечивает прохождение их через пищеварительный тракт без повреждения и длительность сохранения в активном состоянии в просвете кишечника [78, 97]. Губительное влияние желудочного сока связано, прежде всего, с понижением внутриклеточного рН и уменьшением градиента по отношению к внеклеточному значению рН, что приводит к уменьшению движущей силы протонов, дающей энергию для трансмембранных транспортных процессов. Кроме того, снижение рН внутри клетки инактивирует некоторые ферменты, денатурирует белки и ДНК. Желчные кислоты обладают

антимикробной активностью и действуют как детергенты, разрушая биологические мембраны и инициируя внутриклеточное окисление [38].

При разработке пробиотиков, предназначенных для детей, вопросы устойчивости пробиотических микроорганизмов к природным ингибиторам пищеварительной системы не являются ключевыми, поскольку желудочный сок детей первого года жизни отличается низкой кислотностью (рН 4,0–4,5), которая не может значительным образом снизить количество клеток экзогенной микрофлоры, поступающей *per os* (в том числе с пробиотиком). Невысокой является и бактерицидная активность тонкого кишечника. С возрастом антибактериальная система желудка и проксимального участка тонкой кишки возрастает. У взрослого человека экстремально кислый желудочный сок (рН 0,8–1,5), высокая концентрация желчи, панкреатических ферментов и других ингибиторов роста микрофлоры в двенадцатиперстной кишке является одной из основных причин того, что полости этих участков почти стерильны (10^3 – 10^4 КОЕ/мл) и при прохождении этих отделов ЖКТ значительная часть клеток погибает. Клинико-экспериментальные исследования показали, что под действием желудочного сока и дуоденального содержимого пробиотики теряют до 90 % и более жизнеспособных клеток на момент попадания в кишечник. Поэтому вопросам резистентности микрофлоры к факторам антимикробной защиты организма следует уделять должное внимание при создании пероральных пробиотиков для детей старше 2-х лет и взрослых [188, 206, 229, 247].

Исследования, проведенные Т. С. Егоровой с соавт. [59] показали, что выживаемость лактобактерий после экспозиции в модельных растворах, имитирующих условия желудка и кишечника, снижается в 5×10^5 раз. В опытах *in vitro* было обнаружено снижение на 3–5 порядков числа жизнеспособных бифидо- и лактобактерий сначала в кислой, а затем в щелочной модельных средах, имитирующих процесс пищеварения у человека [45]. Эти данные были подтверждены в экспериментах *in vitro*, в которых вместо модельных сред использовали желудочный сок и дуоденальное содержимое человека и в опытах на экспериментальных животных с использованием маркированных пробиотиков.

Выполненные исследования показали, что численность жизнеспособных пробиотических микроорганизмов критически снижается [44, 152]. В исследованиях В. А. Несчисляева с соавт. [110, 114] отмечена более высокая резистентность штамма *L. plantarum* 8P-A3 к действию желудочного сока и желчи по сравнению со штаммом *B. bifidum* 1, в отношении которого действие биологических жидкостей оказалось весьма выраженным. Чувствительность пробиотических штаммов бактерий к действию биологических жидкостей изучена в ряде экспериментальных исследований отечественных [19, 39, 43, 46, 74, 78] и зарубежных [192, 194, 201, 242, 250, 253] авторов. Результаты данных исследований подтверждают, что факторы антимикробной защиты верхних отделов ЖКТ человека являются критическими для выживаемости пробиотических бактерий, однако резистентность бактерий к стрессовым условиям варьируется в зависимости от вида и штамма. Учитывая вышесказанное, необходимым и перспективным направлением при получении лекарственных форм пробиотиков для перорального приема является применение технологических приемов, обеспечивающих более высокую выживаемость бифидо- и лактобактерий в ЖКТ и эффективную временную колонизацию ими естественных зон обитания [160, 188, 222, 248, 252].

1.3 Иммобилизация как метод повышения устойчивости пробиотиков

С целью защиты пробиотиков от бактерицидного воздействия в верхних отделах ЖКТ можно использовать следующие подходы:

а) заключение лиофилизированной биомассы в кислотоустойчивые капсулы, не растворяющиеся в желудке, или покрытие желатиновых капсул защитным слоем («Примадофилус», «Бифиформ», «Максилак»). Однако, кислотоустойчивые капсулы мгновенно растворяются в щелочных условиях двенадцатиперстной кишки, среда которой также неблагоприятна для микрофлоры, как и в полости желудка. Это приводит к массовой гибели клеток

пробиотической культуры еще задолго до ее восстановления из лиофилизированного состояния [89, 188].

б) добавление в препарат вспомогательных веществ, обладающих антацидными свойствами (карбонат кальция, карбонат магния, гидроксид алюминия и др.).

в) селекция и отбор резистентных штаммов бифидо- и лактобактерий, выживающих как в кислой среде желудка, так и в агрессивных зонах тонкого отдела кишечника [166, 177, 215, 246]. Так, используя специально разработанные методы, основанные на усилении адаптивных механизмов пробиотических микроорганизмов при культивировании их в неблагоприятных условиях с последующим отбором клонов с ценными биологическими свойствами, Д. С. Янковский с соавт. [188] получили 88 штаммов бифидобактерий, характеризующихся высокой резистентностью к естественным ингибиторам пищеварительного тракта. В исследовании В. И. Байбакова с соавт. [14] также получен новый штамм *B. bifidum* 791 БАГ, обладающий более высокой кислотоустойчивостью.

г) иммобилизация клеток на различных сорбентах (алюминия гидроксид, микрокристаллическая целлюлоза, активированный уголь и др.), в гелевых микрокапсулах [34, 42, 125], в матрице на основе нанонитей поливинилпирролидона [40]. В ряде работ [115, 155] установлена выраженная устойчивость бифидобактерий, иммобилизованных на геле алюминия гидроксида, к действию желудочного сока и желчи.

Иммобилизованные клетки – такие клетки, для которых созданы искусственные ограничения подвижности во внешней среде, а материальный посредник, обеспечивающий эти ограничения подвижности, является носителем. Иммобилизация (закрепление) субстанций на органических и неорганических носителях активно применяется в медицине и биотехнологии. Использование иммобилизации позволяет создать препараты, обладающие высокой эффективностью и стабильностью. Создание такого рода препаратов является актуальной задачей в России и за рубежом [86, 96, 129].

Иммобилизованные препараты по своей эффективности превосходят традиционные пробиотики на основе жидких или сухих культур бифидо- и лактобактерий. Терапевтический и профилактический эффект иммобилизованных препаратов обусловлен совместным действием живых бактерий, а также защитными и детоксикационными свойствами самого энтеросорбента. Иммобилизованные бактерии более устойчивы к инактивирующим факторам внешней среды, в том числе ЖКТ, что значимо при прохождении через желудок и длительном хранении. Энтеросорбент, помимо функции доставки бактерий в кишечник, выполняет и детоксикационную функцию, уменьшая метаболическую нагрузку на органы детоксикации (печень, почки, иммунную систему). Все это приводит к синергетическому усилению терапевтического эффекта [86, 151].

При разработке иммобилизованных форм биологических препаратов важнейшим моментом является выбор сорбента-носителя. Современные энтеросорбенты должны соответствовать следующим критериям: нетоксичность; нетравматичность для слизистых оболочек ЖКТ; хорошая эвакуация из кишечника; высокая сорбционная емкость; удобная фармацевтическая форма, отсутствие отрицательных органолептических свойств сорбента; благоприятное влияние или отсутствие воздействия на микробиоту ЖКТ [86, 116].

Для иммобилизации клеток микроорганизмов могут быть использованы носители органической (целлюлоза, лигнин, хитин) или неорганической (глины, песок, кремнеземы, угли) природы, искусственные неорганические носители (углеродные материалы) и синтетические полимеры (полиэтилен, нейлон), а также природные биodeградируемые материалы (альгинат, фукоидан, хитозан, каррагинан, пектин) [89].

Общие принципы получения иммобилизованных клеток систематизируют по нескольким признакам:

а) по природной силе, удерживающей клетки в зоне носителя:

- химический метод – основан на создании между поверхностью клетки и материала носителя ковалентных связей;

- физический метод – основан на удерживании клетки носителем за счет физических факторов (например, адсорбции).

б) по конечному состоянию удерживаемой носителем клетки:

- иммобилизация клеток на поверхности носителя (поверхность удерживаемой носителем клетки свободно «омывается» внешней средой);

- в массе (объеме) носителя (между внешней средой и клеткой есть слой материала носителя и обмен веществ между клеткой и средой осуществляется через этот слой);

- с использованием мембранной технологии (клетка и небольшая часть внешней среды помещены в замкнутый объем, отделенный от остальной среды полупроницаемой мембраной). К данной технологии относится микрокапсулирование – иммобилизация пробиотических бактерий в геле на основе альгината кальция, каппа-каррагинана, желатина, хитозана, пищевых растительных волокон и др. [68, 86].

Адсорбция микроорганизмов на поверхности материала носителя является одним из распространенных способов иммобилизации живых клеток. Метод основывается на естественной способности микроорганизмов закрепляться на разнообразных твердых или гелеобразных носителях и продолжать свою жизнедеятельность в таком обездвиженном состоянии. Разнообразие свойств поверхности клеток и адсорбентов обуславливает различные механизмы адсорбционного взаимодействия. Причинами адгезии клеток на адсорбент являются образование химических связей между поверхностями клетки и адсорбента (хемосорбция), ион-ионное взаимодействие (образование ионных пар и триплетов), электростатическое взаимодействие заряженных поверхностей клеток и адсорбента, флокуляция и коагуляция (образование агломератов, в том числе и на поверхности адсорбента) и т.п. Адсорбционные методы относятся к числу наиболее простых и естественных, поскольку в природе микроорганизмы почти всегда существуют не в свободной форме, а в адсорбированном состоянии (микроорганизмы почвы, кишечника, азотфиксирующие микроорганизмы растений) [68].

Еще одним преимуществом адсорбционной иммобилизации является простота методов ее проведения. Статический способ заключается в том, что адсорбент вносят в суспензию клеток, далее полученную смесь инкубируют некоторое время без перемешивания. Иммобилизация достигается за счет осаждения клеток и последующей их адсорбции на частицах носителя. Способ с перемешиванием предусматривает непрерывное поддержание суспензии клеток и частиц адсорбента в диспергированном состоянии, что обеспечивает более быстрое завершение процесса адсорбции и более равномерное заполнение поверхности адсорбента клетками [67, 68].

К настоящему времени производится несколько препаратов, в состав которых входят бифидобактерии, иммобилизованные на частицах активированного угля: «Бифидумбактерин форте», «Пробифор», «Бифилактрин», «Флорин форте», «Кальцидум». По мнению разработчиков, сорбированный препарат активно колонизирует слизистую оболочку кишечника за счет создания высокой локальной концентрации бифидобактерий, что позволяет им лучше сохраняться при прохождении по ЖКТ и колонизировать его слизистую. Быстрое заселение кишечника бифидобактериями способствует нормализации количественного и качественного состава микрофлоры и стимулирует репаративный процесс слизистой оболочки кишечника. Препараты «Бифидумбактерин форте» (капсулы) и «Пробифор» (порошок в пакете) представляют собой лиофильно высушенные клетки иммобилизованных бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1 с наполнителем лактозой. «Бифилактрин» представляет собой смесь иммобилизованных бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1, лактобактерий штаммов *L. plantarum* 8P-A3 и *L. fermentum* 90-TC-4 с наполнителем лактозой. «Флорин форте» (капсулы, порошок в пакете) – комплексный пробиотик, включающий сорбированные на косточковом угле бифидобактерии, лактобактерии и лактозу. «Кальцидум» – минералпробиотик – смесь лиофильно высушенных иммобилизованных бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1, глюконата кальция и лактозы [57, 102, 128, 136, 165].

Многочисленные клинические испытания указанных сорбированных пробиотиков у детей различного возраста и у взрослых с острыми и хроническими поражениями кишечника показали высокую клинико-микробиологическую эффективность при отсутствии каких-либо побочных действий [53, 66, 80, 137, 168, 170].

Проведенные исследования устойчивости пробиотических бактерий, входящих в состав препаратов «Бифидумбактерин форте», «Флорин форте» и «Пробифор» к желудочному соку и желчным кислотам показали, что воздействие указанных факторов не приводит к существенному снижению выживаемости исследуемых бактерий [27, 95].

Однако, активированный уголь не обладает селективностью связывания, в результате длительного приема может привести к снижению уровня витаминов, гормонов, некоторых микроэлементов, а способность сорбента связывать микробные клетки может приводить к дополнительному повреждению ценозных биопленок и усилению дисбиотических сдвигов. Применение активированного угля противопоказано при эрозивно-язвенных поражениях слизистой оболочки пищевода, желудка, кишечника. В связи с этим курсы применения иммобилизованных пробиотиков на угольных сорбентах, не могут быть продолжительными [189].

В препаратах «Биосорб-бифидум», «Экофлор» применяется углерод-минеральный энтеросорбент СУМС-1. Этот сорбент по сравнению с активированным углем, более приемлем для получения иммобилизованных препаратов. В отличие от тонкопористого активированного угля, СУМС-1 имеет развитую структуру макро-, мезо- и микропор, не забивается в верхних отделах кишечника, проявляет свои сорбционные свойства по всей длине ЖКТ. Поверхность сорбента СУМС-1 обладает определенными буферными антацидными свойствами, что дополнительно защищает клетки от повреждающего действия желудочного сока [105, 151].

В препарате «Литовит С» в качестве носителя для бактерий используется комбинированная матрица «литовит», представляющая собой комплекс

минерального компонента (цеолитов) и пищевых волокон (пшеничные и ржаные отруби). Цеолит является природным адсорбентом, связывающий низкомолекулярные токсины. Пищевые волокна дополнительно способствуют нормальному функционированию пищеварительной системы [151].

Новым направлением в разработке сорбированных пробиотиков является создание целевых пробиотических препаратов, в которых сорбированные бифидо- и лактобактерии сочетаются с фармацевтическими субстанциями. Представителем этого направления является препарат «Гепифор», содержащий бифидо- и лактобактерии, сорбированные на коллоидном диоксиде кремния, и экстракт из плодов расторопши, направленный на лечение токсических поражений печени [87, 98, 149].

Разработаны технологии получения поликомпонентного сорбированного на карбонизированной рисовой шелухе пробиотического препарата «Рисо-Лакт» в виде иммобилизованной сухой биомассы в ампулах [75]. В исследованиях установлено, что прикрепление лактобактерий на карбонизированные сорбенты (зауглероженные виноградные косточки и рисовая шелуха) оказывает защитное действие – их устойчивость к воздействию желудочной среды более чем в 50 раз превосходит жидкий концентрат из свободных лактобактерий. Микроколонии, образующиеся на карбонизированных сорбентах, способствуют быстрой адгезии на поверхности слизистой оболочки кишечника, что приводит к ускорению терапевтического действия пробиотиков. Установлено, что антимикробная активность – важнейшая характеристика эффективности пробиотического действия у лактобактерий, иммобилизованных на рисовой шелухе, возрастает на 25–60 % [71, 76, 77, 132, 140].

Разработан препарат на основе лактобактерий, иммобилизованных на коллагене в виде пластинок, применяемый при дисбиозах полости рта [148].

Разработана жидкая форма иммобилизованного мультипробиотика на основе пробиотических штаммов родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и минерального сорбента из семейства цеолитов. Серия опытов по изучению кислотоустойчивости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий показала, что

иммобилизация клеток на сорбенте оказывает протективное действие в условиях с низким значением рН [18, 86].

За рубежом в последние годы активно развивается сфера продуктов функционального питания, роль определяющего «функционального» компонента в которых играют пробиотические микроорганизмы. К таким продуктам функционального питания предъявляется ряд требований: сохранение оптимальной дозы микроорганизмов в течение всего срока годности, бактерии должны оставаться активными при прохождении через ЖКТ человека, иметь доказанную клиническую эффективность [133, 184, 237, 238]. В связи с этим большое количество работ зарубежных авторов посвящено исследованию способов защиты пробиотических бактерий от агрессивных факторов ЖКТ – низкого значения рН желудочного сока, действия ферментов и желчи, чтобы обеспечить доставку оптимального количества микроорганизмов в кишечник, а также продлить срок хранения продуктов функционального питания, содержащих пробиотические бактерии [193, 200, 217, 239, 254].

Для защиты пробиотических клеток активно используется технология микрокапсулирования – иммобилизация пробиотических бактерий в гелевых микрокапсулах на основе альгината кальция, каррагинана, желатина, хитозана, агарозы, крахмала, камеди, пищевых растительных волокон и других материалов, которые сохраняют свою структуру в желудке и поступают в кишечник [214, 219, 235, 243, 244]. Микрокапсулированные пробиотические бактерии применяются при производстве молочных продуктов (сыр, йогурт, мороженое) [205, 224, 228, 234], а также для обогащения широкого спектра других продуктов функционального питания (шоколад, овощные и фруктовые соки, соусы, сухие злаковые смеси и др.) [216, 221, 226, 230].

Многочисленные исследования зарубежных авторов посвящены изучению устойчивости пробиотических микроорганизмов, заключенных в микрокапсулы, к действию искусственных сред, имитирующих условия ЖКТ человека, а также длительности сохранения жизнеспособности бактерий в пищевых продуктах.

V. Jayalalitha et al., исследуя устойчивость *L. acidophilus*, *B. longum* и *B. lactis* в средах, имитирующих условия ЖКТ человека, установили, что иммобилизация пробиотических бактерий с помощью микрокапсулирования в альгинате кальция позволяет значительно повысить устойчивость данных штаммов к действию искусственного желудочного и кишечного сока [225]. Однако, ряд авторов отмечают, что недостатком микрокапсул альгината кальция является появление микротрещин в оболочке в условиях с низким значением pH, что приводит к высвобождению клеток в желудке. Исследования R. R. Mokkaram et al. показали, что покрытие микрокапсул альгината кальция с клетками *L. acidophilus* и *L. rhamnosus* дополнительными одним или двумя слоями альгината кальция обеспечивает достоверно большее значение выживаемости клеток после экспозиции в искусственном желудочном соке по сравнению с непокрытыми микрокапсулами и свободными клетками [251]. A. L. Liserre et al. проводили микрокапсулирование штамма *B. animalis* в альгинате кальция с последующим покрытием микрокапсул хитозаном и установили, что свободные клетки гибнут через 15 мин в искусственном желудочном соке со значением pH 1,5, тогда как микрокапсулированные клетки сохраняют выживаемость в течение 1 часа [232]. Аналогичные данные, подтверждающие, что микрокапсулирование в альгинате кальция [202, 208, 233], покрытие микрокапсул дополнительным слоем альгината, хитозана [197, 198, 207, 212, 229, 236], пальмового масла [203], а также добавление в микрокапсулы пребиотиков (инулин, псиллиум, фрукто- и олигосахариды) [191, 195, 199, 223, 227, 249] позволяет значительно повысить выживаемость различных штаммов лакто- и бифидобактерий после экспозиции в искусственном желудочном соке, приведены во многих работах.

Сходные данные были получены рядом авторов, которые исследовали микрокапсулирование пробиотических микроорганизмов с применением желатина [190, 209], крахмала [210, 211], камеди [196, 204], сывороточного протеина [213, 240, 245].

В настоящее время большое внимание уделяется изучению биологически активных веществ, выделенных из бурых водорослей. Биологическая ценность

водорослей обусловлена высоким содержанием в них полисахаридов (альгинаты и фукоиданы), полиненасыщенных жирных кислот, минеральных элементов, йода в виде минеральных и органических соединений, проявляющие широкий спектр биологической активности, что является причиной повышенного интереса к ним [6, 123, 150]. Результаты применения биогеля из бурых водорослей при лечении заболеваний ЖКТ показали, что он обладает противовоспалительным, обволакивающим и спазмолитическим действием, снижает агрессивную активность среды желудка, способствует подавлению патогенной и восстановлению облигатной микрофлоры человека. Это дало основание для более подробных исследований влияния альгинатсодержащих продуктов на облигатную микрофлору кишечника [123].

В научной литературе опубликованы результаты исследований, которые позволяют судить о перспективности использования продуктов переработки водорослей в качестве пребиотиков [72, 73, 241]. Исследования Н. М. Аминой с соавт. [54] показали, что биогель из бурых водорослей «Ламиналь» обладает пребиотическими свойствами и активизирует развитие бифидобактерий. Установлено высокое нормализующее и стабилизирующее воздействие «Ламиналя» на состояние микрофлоры пищеварительного тракта в комплексе с бифидосодержащими препаратами. Эффективное лечебно-профилактическое действие на ЖКТ – результат более высокой колонизационной активности бактерий в присутствии биогеля из водорослей [7, 83]. Дальнейшие исследования показали, что альгинаты биогеля могут расщепляться под действием ферментов выделяемых бифидобактериями в среду с образованием простых низкомолекулярных веществ, которые затем захватываются бактериальной клеткой и подвергаются дальнейшей утилизации с образованием энергии и конечных продуктов [120].

Расширяются исследования по использованию продуктов переработки водорослей в производстве кисломолочных продуктов (йогурт, кефир, творог). Показана возможность получения кисломолочных продуктов с бифидобактериями на основе биогеля из водорослей [85, 106]. Клинические

испытания кисломолочного напитка на основе биогеля «Ламиналь» и бифидобактерий свидетельствовали об усилении положительного эффекта на микробиоценоз кишечника при использовании бифидобактерий в комплексе с биогелем [36, 84].

Исследования Е. Л. Коневой с соавт. [37] показали, что бифидобактерии штамма *B. bifidum* 791 в присутствии альгината натрия и биогеля проявляет более высокие адгезивные свойства, что связано с повышением степени аутоагрегации и гидрофобности клеточной поверхности. Таким образом, альгинат натрия и биогель из бурых водорослей помимо пребиотического действия обладают способностью облегчать процесс адгезии бифидобактерий к клеткам кишечника.

На сегодняшний день известны продукты функционального питания в форме драже «Ламинолакт» и «Биламинолакт» в состав которых, кроме молочнокислых и бифидобактерий, входит ламинария и другие растительные добавки, позволяющие добиться более специфического действия. Клиническая эффективность драже «Ламинолакт» показана в многочисленных медицинских апробациях у пациентов с различными заболеваниями [4, 17, 51, 52, 69, 142].

Разработаны и прошли клиническую апробацию препараты с использованием альгината натрия («Альгилак», «Альгибиф») и порошка бурой водоросли ламинарии «ЛВ-Ламинария». Доказано, что применение этих препаратов приводит к сокращению сроков клинических проявлений хронических заболеваний ЖКТ, острых кишечных инфекций, гепатита, к улучшению копрологической картины и сокращению длительности пребывания пациентов в стационаре на 2–3 дня [93, 94].

1.4 Технологические аспекты производства пробиотиков

Технология получения пробиотических препаратов включает следующие основные технологические стадии: культивирование производственных штаммов бактерий, лиофилизация бактериальных культур, изготовление лекарственных

форм пробиотиков. В условиях крупномасштабного производства регламентированным способом накопления биомассы бифидо- и лактобактерий является метод периодического культивирования. Для накопления биомассы в настоящее время широко используется казеиново-дрожжевая среда [111].

Общепринятый способ получения лекарственных форм пробиотиков базируется на использовании сухой бактериальной биомассы, получаемой, как правило, лиофилизацией производственных культур с добавлением защитных сред. Процесс лиофилизации (сублимационного высушивания), заключающийся в удалении воды из замороженных биоматериалов в вакууме, является, в настоящее время, наиболее надежным и удобным для практического применения. При сублимационном высушивании вода из объектов удаляется без нарушения нативной структуры белков; в клетках резко замедляются или прекращаются биохимические реакции, в результате чего они становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия и сохраняют первоначальные свойства в течение длительного периода времени [108].

Замораживание и высушивание требуют обязательного применения защитных сред (ксеропротекторов), защищающих мембранные структуры клеток при потере воды. В исследованиях В. А. Несчисляева [111] разработан состав унифицированного варианта защитной среды на основе желатина, сахарозы и молока, обеспечивающий биопротективный и структурообразующий эффект в производстве целого ряда пробиотических препаратов.

Иммобилизацию бактериальных культур проводят непосредственно перед процессом лиофильного высушивания, к которому они становятся более устойчивы, что выражается в меньшей потере жизнеспособности.

Среди существующих лекарственных форм (ЛФ) пробиотиков особый интерес представляют капсулы. Капсулы – дозированная ЛФ, состоящая из лекарственных и вспомогательных веществ, заключенных в твердую или мягкую оболочку. Твердые желатиновые капсулы (ТЖК) предназначены для дозирования сыпучих порошкообразных, гранулированных и микрогранулированных веществ. Они имеют форму цилиндра с полусферическими концами и состоят из двух

частей – корпуса (тела) и крышечки [135]. Ассортимент капсулированных препаратов чрезвычайно разнообразен и представлен практически во всех фармакотерапевтических группах. Номенклатура препаратов в капсульной форме с каждым годом увеличивается, что связано с рядом потребительских, биофармацевтических и технологических преимуществ, присущих этой ЛФ, в частности [47]:

- точность дозирования и минимальные потери фасуемого продукта;
- высокая стабильность – оболочка капсул обеспечивает защиту содержимого от различных неблагоприятных факторов внешней среды (кислород воздуха, прямой солнечный свет, перепады влажности и др.);
- высокая биодоступность – капсулы быстрее распадаются, чем таблетки или драже;
- корректирующая способность – оболочка капсул позволяет скрыть неприятный вкус, запах, цвет лекарственных веществ;
- возможность задавать препаратам определенные свойства (желудочно- и кишечнорастворимые капсулы распадаются и всасываются в определенном отделе ЖКТ, ретард-капсулы с пролонгированным высвобождением лекарственного средства);
- высокая эстетичность капсул – достигается благодаря применению различных красителей при получении оболочек капсул и окончательной обработки капсул после их наполнения (полировка);
- повышение эффективности лечения и точности дозировки, так как капсулы принимаются целиком, и не делятся как таблетки;
- использование щадящих технологических режимов – приемы инкапсулирования, позволяющие избегать нежелательных для многих лабильных веществ воздействий влаги (например, при влажном гранулировании), давления (например, при прессовании таблеток) и применение минимального количества вспомогательных веществ (наполнителей, дезинтегрантов, лубрикантов);
- производство их полностью механизировано или автоматизировано [135].

Анализ Государственного реестра лекарственных средств (ЛС) показал, что капсулированные ЛС составляют около 6 % от общего числа зарегистрированных ЛС. Этот показатель значительно ниже для российского рынка, чем для зарубежного, в странах которого (с развитой фармацевтической промышленностью) до 20 % ЛС присутствуют в форме капсул. Анализ структуры ассортимента по стране-производителю на российском фармацевтическом рынке показал преимущественную долю (56 %) присутствия ЛС в форме ТЖК зарубежного производства и только 44 % – отечественного. Таким образом, номенклатура ЛС в капсульной форме на отечественном фармацевтическом рынке находится в настоящее время на стадии развития и имеет широкие потенциальные возможности для расширения ассортимента [47].

Совершенствование автоматических капсулонаполняющих машин (производительности и способов наполнения) сопровождалось изменением дизайна капсулы. На сегодняшний момент наиболее востребованными являются капсулы Coni-snar, отличительной особенностью которых является наличие сужающегося края тела капсулы и кольцевых бороздок на корпусе и на крышечке для плотного и герметичного закрытия капсулы после наполнения. Применение таких капсул обеспечивает стабильную работу высокопроизводительных машин за счет наличия зазора между крышечкой и телом капсулы, через который в момент быстрого закрытия после наполнения продуктом выходит свободный воздух, что препятствует ее разрушению и деформации [135].

Широкое промышленное производство капсулированной ЛФ пробиотиков до последнего времени сдерживалось из-за традиционной приверженности к выпуску препаратов в виде лиофилизированной биомассы во флаконах.

Таким образом, анализ литературных данных показал, что разработка пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток является целесообразной и перспективной. Повышенный терапевтический и профилактический эффект иммобилизованных препаратов обусловлен совместным действием пробиотических бактерий, а также защитными и детоксикационными свойствами самого сорбента. Иммобилизованные бактерии

более устойчивы к инактивирующим факторам внешней среды и ЖКТ. Наиболее естественным и эффективным методом иммобилизации клеток можно считать адсорбцию на гелеобразных и твердых носителях.

Исходя из вышеизложенного, представляется актуальным направление, связанное с разработкой пробиотических препаратов на основе иммобилизованных бактерий, что позволит расширить ассортиментный ряд отечественных препаратов, восстанавливающих микробиоту. Использование органических сорбентов природного происхождения предполагает получение иммобилизованных препаратов, представляющих собой пробиотические комплексы, биологическая активность которых дополнена биологическим потенциалом (пребиотического и иного характера) носителя.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Микроорганизмы

В работе использовали производственные штаммы: *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Lactobacillus plantarum* 8P-A3.

Штамм *B. bifidum* 1 (коллекционный № 900791 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ), Россия), принадлежит к семейству *Actinomycetaceae*, роду *Bifidobacterium*, виду *B. bifidum*.

Бифидобактерии штамма *B. bifidum* 1 представляют собой неподвижные грамположительные полиморфные палочки длиной 4-5 мкм с бифуркацией на одном или двух концах, располагающиеся в виде скоплений или отдельных клеток. На полужидких средах вызывают равномерное помутнение среды, а через 2-3 сут образуют рыхлый осадок, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэрибиоза). Отдельные колонии бифидобактерий при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «гвоздей», «зерен» или «комет» белого цвета. На плотных средах образуют круглые мелкие белые колонии. Являются облигатными анаэробами. Оптимальная температура для роста составляет (38 ± 1) °С. Активность кислотообразования при выращивании в печеночной среде составляет не менее 100 градусов по Тернеру (°Т) [2].

Штамм *L. plantarum* 8P-A3 (коллекционный № 900811 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ), Россия) относится к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*, виду *L. plantarum*.

Бактериальные клетки штамма представляют собой неподвижные грамположительные палочки длиной от 0,7 до 3,0 мкм, располагающиеся беспорядочными скоплениями и отдельными короткими цепочками, капсул и спор не образуют. Лактобактерии – факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа или азота, а также в присутствии кислорода. На жидкой среде МРС-1 вырастают в виде равномерной мути и гомогенного белого

осадка на дне пробирки, на полужидкой среде МРС-2 образуют изолированные колонии в виде тяжей. На плотной среде МРС-4 образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии. Оптимальная температура роста (37 ± 1) °С. Активность кислотообразования при выращивании лактобактерий на среде МРС-1 должна быть не ниже 230 °Т [1].

Антагонистическую активность бифидо- и лактобактерий изучали с применением тест-штаммов *Escherihia coli* 157 и *E. coli lum*⁺.

2.2 Препараты

Коммерческие препараты: «Бифидумбактерин», «Лактобактерин» (филиал АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»), «Бифидумбактерин форте» (ЗАО «Партнер», Россия).

Модельные среды, имитирующие условия ЖКТ человека:

- кислый раствор пепсина (искусственный желудочный сок) следующего состава: пепсин – 3 г, кислота соляная концентрированная – 6 мл, вода очищенная до – 1 л [50];

- щелочной раствор панкреатина следующего состава: панкреатин – 3 г, натрия гидрокарбонат – 15 г, вода очищенная до – 1 л [50];

- желчь медицинская консервированная (ООО «САМСОН-МЕД», Россия).

Микробиологический индикатор токсичности (МИТ), представляющий собой лиофилизированную культуру люминесцентных бактерий штамма *E. coli lum*⁺. Разработан в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ТУ 6-09-20-236-93, ТУ 846-001-0453805-00).

Коммерческие диски антибиотиков: ампициллин, цефазолин, цефалотин, цефуроксим, цефатоксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефалексин, цефепим, тетрациклин, левомицетин, канамицин, гентамицин, тобрамицин, офлоксацин, карбенициллин, полимиксин, фурадонин, амикацин, ципрофлоксацин (НИЦФ, г. Санкт-Петербург).

Формализированные эритроциты барана для изучения адгезивной активности бактериальных культур (филиал АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»).

2.3 Питательные и защитные среды

Для реакторного культивирования производственных штаммов бактерий использовали казеиново-дрожжевые (КД, КД-5) питательные среды в соответствии с промышленными регламентами на производство препаратов «Бифидумбактерин» и «Лактобактерин» (ПР № 20858541-48-18, ПР № 20858541-56-18).

Для контроля пробиотиков использовали питательные среды: МРС-1, МРС-4, МРС-5, полужидкую модифицированную печеночную среду Блаурокка, плотную среду Блаурокка, мясо-пептонный агар (МПА), питательный агар (ПА) с 9 % натрия хлорида, ПА с глюкозой, среду Сабуро агаризованную, среду Сабуро с хлорамфениколом, тиогликолевую среду («Пермское НПО «Биомед»); питательную среду для выделения энтеробактерий сухую (агар Эндо) (НПО «Питательные среды», г. Махачкала).

В качестве ксеропротекторов для лиофильного высушивания бактериальных культур использовали регламентированную сахарозо-желатино-молочную (СЖМ) среду и новые варианты защитных сред на основе сахарозы и коллагена.

2.4 Сорбенты

- Альгинат натрия (ФС 42-3383-97);
- Клетчатка («Фабрика здорового питания», г. Томск, ТУ9197-004-818285-77-07);

- Крахмал прежелатинизированный («ROQUETTE FRERES», Франция);
- Лигнин гидролизный «Полифепан» (ЗАО «Сайнтекс», г. Санкт-Петербург, Р № ЛС-80/1107/4);
- Ламинария гомогенизированная желированная для диетического (лечебного и профилактического) питания «Сивидал» (ООО «Технологии будущего», г. Москва, ТУ 9284-001-75351480-06);
- Ламинария лиофилизированная (коктейль «Морской» из ламинарии, ООО «Биополимеры», г. Партизанск, ТУ 9284-002-44166115-05);
- Ламинарии слоевища измельченные (ОАО «Красногорсклексредства», г. Красногорск, Р № ЛС-001856);
- Натуральный коллагеновый волокнистый и коротковолокнистый белок «Novapro» («Novaprom Food Ingredients Ltda», Бразилия);
- Отруби пшеничные ферментированные (ЗАО «Ягодное, г. Киров, ТУ 9197-003-05344371-2011);
- Семена льна (ОАО «Красногорсклексредства», г. Красногорск, Р № ЛСР-003208/07);
- Фукус гомогенизированный желированный (ООО «Технологии будущего», г. Москва, ТУ 9284-002-75351480-09);
- Фукус лиофилизированный (БАД «Фукодар С», ООО «Биополимеры», г. Партизанск, ТУ 9284-005-75351480-09);
- Фукуса слоевища измельченные (БАД Фукусы дробленые сушеные, ООО «В-МИН», г. Сергиев Посад, ТУ 9265-003-56529037-04).

2.5 Материалы для изготовления капсулированной лекарственной формы препарата

При разработке состава порошков для наполнения капсул и получения экспериментальных образцов препарата в ТЖК использовали вспомогательные вещества, разрешенные к применению в фармацевтической промышленности:

- каолин (ФС 42-2873-92);
- лактоза 80М (Европейская Фармакопея);
- твердые желатиновые капсулы «Coni-snap» (НД 42-10132-05, Бельгия).

В качестве упаковочного материала для капсул использовали полимерные банки вместимостью 35 мл с винтовой горловиной из полиэтилена высокой плотности, крышки с контролем первого вскрытия с силикагелевой вставкой (Nolato Cerbo, Швеция).

2.6 Физико-химические методы

Определение рН

Определение рН проводили потенциометрическим методом с помощью иономера лабораторного И-160МИ в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15.

Определение сыпучести сухой биомассы и порошков

Сыпучесть определяли в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0016.15 по скорости высыпания определенного количества материала из металлической воронки за определенный период времени на приборе Erweka (Германия).

Показатель сыпучести рассчитывали по формуле:

$$V_c = m / t, \quad \text{где}$$

V_c – сыпучесть, г/с;

m – масса навески, г;

t – продолжительность высыпания порошка, с.

Показатель сыпучести классифицировали по следующим значениям: отличная (8,6–12,0 г/с), хорошая (6,6–8,5 г/с), удовлетворительная (3,0–6,5 г/с), допустимая (2,0–3,0 г/с), плохая (1,0–2,0 г/с), очень плохая (0,3–1,0 г/с).

Определение насыпной плотности

Насыпную плотность определяли в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0016.15. В градуированный цилиндр вместимостью 100 мл помещали

без уплотнения навеску материала в количестве 50,0 г и отмечали объем, занимаемый порошком. Показатель насыпной плотности вычисляли по формуле:

$$P_n = m / V, \text{ где}$$

P_n – насыпная плотность, кг/м³;

m – масса материала, кг;

V – объем материала, м³.

Определение гигроскопичности

Бюксы с пробами помещали в эксикатор (100 % влажность) и периодически с интервалом 2–5 ч взвешивали на аналитических весах до постоянной массы, означающей достижение равновесия между водяным паром в окружающем воздухе и материалом. Прирост поглощения влаги вычисляли по формуле:

$$П = \frac{(A_x - A_0)}{A_0} \times 100 \%, \quad \text{где}$$

$П$ – прирост поглощения, %;

A_x – масса навески после эксикатора, г;

A_0 – начальная масса навески, г [127].

Определение потери в массе при высушивании

Потерю в массе при высушивании определяли гравиметрическим методом согласно ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0010.15. Бюксы высотой 35 мм и диаметром 25 мм доводили до постоянной массы при температуре 100–105 °С. Точную навеску образца 0,15–0,20 г помещали в бюкс, закрывали бюкс и взвешивали. Высушивали с открытой крышкой в вакуум-сушильном шкафу в течение 3 ч при температуре (60±1) °С и остаточном давлении, не превышающем 0,667 кПа (5 мм. рт. ст.). Затем бюксы выдерживали в эксикаторе в присутствии кальция хлорида безводного в течение 30–40 мин до полного охлаждения, закрывали крышками и взвешивали. Проводили не менее двух параллельных определений.

Потерю в массе при высушивании (X) в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)} \times 100 \%, \quad \text{где}$$

m_1 – масса бюкса, доведенного до постоянной массы, г;

m_2 – масса бюкса с образцом до высушивания, г;

m_3 – масса бюкса с образцом после высушивания, г.

Средняя масса и отклонения от средней массы

Определение средней массы и отклонений от массы капсул проводили в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0009.15.

Определение распадаемости капсул

Определение распадаемости проводили в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0009.15 на лабораторном тестере распадаемости PTZ-S производства «Фарматест», Германия.

2.7 Микробиологические методы

Определение полноты иммобилизации

Полноту иммобилизации (% связывания) клеток определяли путем подсчета количества живых клеток (КОЕ/мл) в исходной культуре иммобилизованных клеток и в надосадочной жидкости после инкубации с сорбентом в течение 5 сут при температуре (5 ± 3) °С.

Специфическую активность (количество жизнеспособных бактерий, активность кислотообразования и антагонистическую активность) бифидо- и лактобактерий контролировали в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0009.15.

Определение количества живых бифидо- и лактобактерий (КОЕ)

Определение количества живых бифидо- и лактобактерий проводили методом последовательных десятикратных разведений в пробирках, содержащих по 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Для определения количества КОЕ бифидобактерий из двух последних разведений высевали по 1 мл микробной суспензии в пробирки с 9 мл полужидкой средой Блаурокка, инкубировали в течение (96 ± 4) ч при температуре (38 ± 1) °С и подсчитывали число колоний. Для определения количества КОЕ лактобактерий из двух последних разведений высевали по 0,1 мл микробной суспензии на чашки Петри с плотной питательной

средой МРС-4. Подсчет числа выросших колоний проводили после (44 ± 4) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С.

Лиофилизат во флаконе предварительно ресуспендировали 0,9 % раствором натрия хлорида до восстановления изначально высушенного объема, 0,2 г сухой биомассы суспендировали в 9,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 1,0 г порошка – в 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Определение активности кислотообразования бифидо- и лактобактерий

Активность кислотообразования определяли по титруемой кислотности при культивировании бактерий в адекватной питательной среде. Определение проводили методом кислотно-основного титрования. Лиофилизат во флаконе ресуспендировали 0,9 % раствором натрия хлорида до восстановления изначально высушенного объема; 0,2 г биомассы суспендировали в 9,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, содержимое капсулы – в 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем по 2,5 мл полученной суспензии вносили в 2 пробирки с 25 мл печеночной среды Блаурокка (для бифидобактерий) или среды МРС-1 (для лактобактерий). Посевы с бифидобактериями инкубировали в течение 72 ч при температуре (38 ± 1) °С, посевы с лактобактериями – в течение 48 ч при температуре (37 ± 1) °С.

После окончания инкубации проводили определение активности кислотообразования в каждой пробирке: пробу в объеме 10 мл титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида до достижения рН $(8,5 \pm 0,1)$. Показатель активности кислотообразования, выраженный в градусах Тернера (°Т) вычисляли по формуле:

$$^{\circ}\text{T} = \text{A} \times \text{K} \times 10, \quad \text{где}$$

А – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование 10 мл исследуемой суспензии, мл;

К – коэффициент поправки к титру 0,1 М раствора натрия гидроксида;

10 – объем анализируемой пробы, мл.

Определение антагонистической активности методом отсроченного антагонизма

Образцы бифидо- и лактобактерий ресуспендировали 0,9 % раствором натрия хлорида (лиофилизат во флаконе – до восстановления изначально высушенного объема; 0,2 г сухой биомассы – в 9,8 мл). Полученную суспензию высевали штрихом по диаметру чашки Петри бактериологической петлей на плотную среду Блаурокка (для бифидобактерий) или МРС-5 (для лактобактерий). Посевы бифидобактерий инкубировали в анаэробных условиях (в анаэростате с использованием газогенерирующих пакетов для анаэробов «BD BBL™», США) в течение (96 ± 4) ч при температуре (38 ± 1) °С, посевы лактобактерий – в аэробных условиях в течение (44 ± 4) ч при температуре (37 ± 1) °С. Индикаторную культуру *E. coli* 157, предварительно выращенную на МПА в течение (22 ± 2) ч в аэробных условиях, смывали 0,9 % раствором натрия хлорида, доводили ее оптическую плотность до 5 единиц по ОСО 42-28-86 и подсеивали перпендикулярно к выросшей культуре. Учет результатов проводили по величине зон угнетения роста тест-штамма через (22 ± 2) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С.

Определение влияния бифидо- и лактобактерий на биолюминесценцию тест-штамма *E. coli lum*⁺ при совместной экспозиции

Образцы регидратировали 0,9 % раствором натрия хлорида. Тест-штамм люминесцентных бактерий регидратировали 0,9 % раствором натрия хлорида, охлажденным до температуры (5 ± 3) °С, выдерживали не менее 30 мин при температуре (5 ± 3) °С и доводили его объем до 50 мл. При подготовке опытной пробы 0,5 мл исследуемого образца смешивали с 0,5 мл индикаторной культуры. При подготовке контрольной пробы к тест-культуре добавляли 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Уровень подавления или стимуляции свечения индикаторной культуры контролировали через определенные промежутки времени (10 мин, 1, 2, 4, 6 и 24 ч) с помощью люминометра «Биотокс-10М» (Россия), который автоматически вычислял индекс антагонистической активности (ИАА) путем расчета среднеарифметического значения из трех параллельных

измерений (контроль-опыт). ИАА – безразмерная величина, численно равная проценту подавления свечения по сравнению с исходным уровнем:

$$\text{ИАА} = \frac{X_1 - X_2}{X_1} \times 100, \text{ где}$$

X_1 – интенсивность биолюминесценции контрольной пробы;

X_2 – интенсивность биолюминесценции опытной пробы [126].

В качестве критерия оценки уровня антагонистической активности были приняты следующие величины ИАА:

- 1) равно или больше 80 – высокая антагонистическая активность;
- 2) от 50 до 79 – средняя антагонистическая активность;
- 3) меньше 50 – низкая антагонистическая активность.

Контроль микробиологической чистоты

Микробиологическую чистоту определяли в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0002.15.

Определение устойчивости бактерий к действию модельных сред, имитирующих условия ЖКТ человека

Устойчивость бактерий определяли в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0012.15. Влияние модельных сред на выживаемость бифидо- и лактобактерий определяли по изменению количества КОЕ после совместной экспозиции. Образцы бифидо- и лактобактерий ресуспендировали 0,9 % раствором натрия хлорида (лиофилизат во флаконе – до восстановления изначально высушенного объема; 0,2 г сухой биомассы – в 9,8 мл). Затем 1 мл полученной суспензии добавляли к 9 мл модельной среды (контроль – 0,9 % раствор натрия хлорида), инкубировали при температуре (37 ± 1) °С (время экспозиции составляло 30 мин – в кислом растворе пепсина, 2 ч – в желчи, 2 ч – в щелочном растворе панкреатина), затем определяли количество жизнеспособных клеток.

Определение антибиотикочувствительности бифидобактерий

Чувствительность бифидобактерий к антибиотикам определяли в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0010.15 с помощью метода диффузии в агар с

использованием стандартного набора дисков и плотной питательной среды. На поверхность плотной среды Блаурокка наносили микробную культуру и накладывали диски с антибиотиками из расчета 5–6 шт на чашку Петри. Посевы инкубировали в анаэробных условиях (в анаэроостате с использованием газогенерирующих пакетов для анаэробов «BD BBL™», США) в течение (96 ± 4) ч при температуре (38 ± 1) °С. Результаты путем измерения диаметров зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков.

Определение адгезивной активности бифидобактерий

Адгезию изучали на модели эритроцитов барана 0 (I) группы *Rh* (+) по методике В. И. Брилис с соавт. [101]. Нативные эритроциты дважды отмывали от консерванта забуференным фосфатами физиологически раствором (ЗФР) с рН 7,2–7,3 при помощи центрифугирования (1000 об/мин) и готовили взвесь с концентрацией 100 млн/мл. Взвеси эритроцитов и бактериальных клеток смешивали в пробирках в равных объемах (по 0,5 мл). Пробирки помещали на шуттель-аппарат и инкубировали при (37 ± 1) °С в течение 30 мин. По окончании срока инкубации смесь трехкратно отмывали ЗФР от неприлипших микробов при 600 об/мин по 10 мин, готовили мазок-препарат и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Средний показатель адгезии (СПА) определяли по среднему количеству микроорганизмов, прикрепившихся к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов. Степень адгезивности считают нулевой при СПА от 0 до 0,99; низкой – от 1,00 до 1,99; средней – от 2,00 до 3,99 и высокой $> 4,00$.

Из числа учитываемых эритроцитов, подсчитывали процент эритроцитов (коэффициент К), имеющих на своих поверхностях прилипшие микробы. Кроме того, подсчитывали индекс адгезивности микроорганизма (ИАМ) – среднее количество микробных клеток на одном эритроците, участвующем в адгезивном процессе, по формуле:

$$\text{ИАМ} = (\text{СПА} \times 100 \%) \div \text{К}$$

Микроорганизмы считают: неадгезивными при ИАМ от 1,00 до 1,75; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,49; среднеадгезивными – от 2,50 до 3,99; высокоадгезивными > 4,00.

2.8 Технологические методы

Культивирование бактерий

Реакторное культивирование производственных штаммов проводили периодическим способом на питательных средах КД и КД-5 с применением рН-корректирующих (раствор аммиака) и углеводных добавок (раствор глюкозы) в соответствии с промышленными регламентами на производство «Бифидумбактерина» и «Лактобактерина» (ПР № 20858541-48-18, ПР № 20858541-56-18).

Иммобилизация бифидо- и лактобактерий на сорбентах

Необходимое количество рабочего разведения сорбента вносили в бутылки с бактериальной взвесью и перемешивали в течение 30 мин для наиболее полного связывания клеток.

Разлив бактериальной суспензии во флаконы и кассеты

В каждую бутылку с бактериальной взвесью в асептических условиях добавляли регламентированные среды высушивания (СЖМ) или экспериментальные защитные среды в различных соотношениях. Готовую бактериальную суспензию разливали во флаконы ФИ-5 по $(2,0 \pm 0,1)$ мл на разливочной машине AVRF-04 («Bosh», Германия) или наливом в металлические кассеты размером $250 \times 250 \times 50$ мм по $(0,55 \pm 0,05)$ л с толщиной слоя до 15 мм.

Лиофильное высушивание

Предварительное замораживание бактериальной суспензии, разлитой во флаконы или металлические кассеты, осуществляли в морозильной камере «Шка» (Германия) при температуре минус (50 ± 10) °С не менее 16 ч. Лиофильное

высушивание препаратов проводили в сублимационной установке ТГ-50 (Германия) в течение (50 ± 6) ч.

Герметизация флаконов

Герметизацию флаконов (укупорку резиновыми пробками и фиксацию их алюминиевыми колпачками) проводили в атмосфере стерильного воздуха с помощью автомата укупорки и обкатки флаконов FFV-4010 («Баур Штребель», Германия).

Подготовка вспомогательных веществ для порошка

Вспомогательное вещество (лактоза, каолин) в необходимом количестве насыпали в кассеты из нержавеющей стали размером $250\times 250\times 50$ мм, закрывали крышками и стерилизовали в суховоздушном шкафу в течение 1 ч при температуре $160\text{ }^{\circ}\text{C}$. Срок хранения наполнителя при температуре $(20\pm 5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ составлял не более 10 сут.

Измельчение сухой биомассы и приготовление порошков

Сухую биомассу извлекали из кассет и подвергали сухой грануляции через сито с ячейками на 0,5 мм. Измельченную биомассу смешивали с расчетным количеством вспомогательных веществ до получения однородного порошка. Готовый порошок хранили в холодильной камере при температуре $(5\pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Наполнение капсул

Для наполнения капсул использовали ручную капсулонаполняющую машину модели МС-1,2 (Италия). Машина позволяет одновременно наполнять 100 капсул. Пустые капсулы за счет ручного капсулоориентирующего устройства помещали в капсулодержатели и открывали. На весах с точностью до 0,01 взвешивали навеску массы для капсулирования. При помощи шпателя навеску равномерно распределяли по поверхности машины до заполнения всех капсул, после чего капсулы закрывали.

Для получения экспериментально-производственных серий препарата использовали комплексную производственную линию, включающую гранулятор (Jackson & Crockatt, Англия), смеситель порошков с вращающимся корпусом (Paterson Kelly, США), капсулонаполнительную машину Zanasi 40F (ИМА,

Италия), обеспыливатель капсул KDP-1 (KD, Корея), счетно-фасовочную машину KDC-101 (KD, Корея), укупорочную машину KDK-100 (KD, Корея).

2.9 Статистические методы

Результаты исследований обрабатывали методами вариационной статистики [48]. Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА И ЭФФЕКТОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ

Известно, что специфическая активность пробиотиков определяется содержанием жизнеспособных клеток в дозе препарата. Учитывая выраженную чувствительность бактерий, входящих в состав пробиотических препаратов, к действию биологических жидкостей, представляется актуальной апробация новых технологических приемов, позволяющих защитить клетки при прохождении верхних отделов ЖКТ и тем самым обеспечить более высокую клиническую эффективность препаратов на их основе. Одним из приемов повышения устойчивости клеток является иммобилизация бактерий на различных носителях.

В настоящее время весьма перспективным направлением представляется разработка препаратов, включающих иммобилизованные клетки на носителе, биологическая активность которого позволяет дополнить спектр терапевтического действия пробиотика. В данной главе представлены материалы по апробации ряда органических сорбентов природного происхождения, потенциально приемлемых для иммобилизации пробиотических бактерий. Изучены их технологические свойства, подобрано оптимальное соотношение бактериальной взвеси и сорбента, исследован протективный эффект иммобилизации клеток при воздействии кислого раствора пепсина (искусственного желудочного сока), а также при лиофильном высушивании.

3.1 Изучение технологических свойств носителей и биологических параметров иммобилизации клеток

Ключевым этапом в разработке препаратов на основе иммобилизованных клеток является подбор адекватного носителя. От его свойств зависит эффективность защиты микроорганизмов от негативного воздействия

биологических жидкостей, а также способность к высвобождению в нижних отделах ЖКТ. При выборе носителя для использования в условиях промышленного производства пробиотиков следует учитывать следующие требования: сорбционные свойства, отсутствие токсичности, доступность, экономичность.

С целью изучения влияния иммобилизации на сохраняемость и свойства бифидо- и лактобактерий были использованы следующие носители – гомогенат бурых водорослей (фукус, ламинария), альгинат натрия, клетчатка, отруби пшеничные ферментированные, лигнин гидролизный (полифепан), семена льна, крахмал прежелатинизированный, МКЦ.

При получении вариантов рабочих разведений носителей был отработан унифицированный способ их стерилизации. Сорбенты стерилизовали в автоклаве однократно при температуре 120 °С и давлении 0,1 МПа в течение 45 мин с последующим контролем стерильности путем посева на плотные и жидкие питательные среды: МПА, ПА с 9 % натрия хлорида, ПА с глюкозой, среду Сабуро агаризованную, тиогликолевую среду. После инкубирования посевов в течение 8 сут на питательных средах рост посторонней микрофлоры не отмечался.

Для обеспечения наиболее полного связывания клеток рабочее разведение сорбента в асептических условиях смешивали с бактериальной взвесью при постоянном перемешивании в течение 30 мин. После этого культуру иммобилизованных клеток выдерживали в течение 5 сут при температуре (5 ± 3) °С и визуально оценивали полноту иммобилизации по характеру расслоения исследуемой взвеси с последующим определением количества живых бактерий в надосадочной жидкости. Быстрое образование и наличие плотного осадка и относительно прозрачной надосадочной жидкости свидетельствует о том, что большинство бактерий находится в адсорбированном состоянии. Бактериальные взвеси бифидо- и лактобактерий без носителей при такой экспозиции не дают выраженную зону просветления и не образуют оформленного осадка из-за более низкой скорости седиментации.

В серии экспериментов изучалась полнота иммобилизации с применением сорбентов на основе бурых водорослей. Было проведено сорбирование лакто- и бифидобактерий с применением в качестве носителя гомогената фукуса и ламинарии. Сорбент готовили из продуктов диетического питания «Сивидал (ламинария гомогенизированная желированная)» и «Фукус гомогенизированный желированный». Были апробированы рабочие разведения гомогената различной концентрации (50 % и 75 %), которые смешивали с взвесью бактериальных клеток в соотношении 1:2 соответственно при постоянном перемешивании в течение 30 мин с последующей оценкой полноты иммобилизации (табл. 1).

Таблица 1 – Полнота сорбции лакто- и бифидобактерий, иммобилизованных на гомогенате бурых водорослей

Бакт. взвесь	Сорбент	Концентрация гомогената в рабочем разведении	КОЕ/мл		Полнота иммобилизации, %
			взвесь иммобилизованных клеток	надосадочная жидкость	
Лактобактерии <i>L. plantarum</i> 8P-A3	Фукус	50 %	$(2,68 \pm 0,52) \times 10^9$	$(1,05 \pm 0,33) \times 10^8$	> 95
		75 %	$(1,93^{* \wedge} \pm 0,05) \times 10^9$	$(0,98 \pm 0,37) \times 10^8$	< 95
	Ламинария	50 %	$(3,48 \pm 0,54) \times 10^9$	$(0,83 \pm 0,18) \times 10^8$	> 95
		75 %	$(2,38^{* \pm} 0,24) \times 10^9$	$(1,18 \pm 0,10) \times 10^8$	< 95
	Бакт. взвесь без носителя (контроль)	–	$(3,63 \pm 0,43) \times 10^9$	–	–
Бифидобактерии <i>B. bifidum</i> 1	Фукус	50 %	$(2,98 \pm 0,41) \times 10^8$	$(1,43 \pm 0,21) \times 10^7$	> 95
		75 %	$(2,93 \pm 0,39) \times 10^8$	$(0,42 \pm 0,04) \times 10^7$	> 98
	Ламинария	50 %	$(1,65 \pm 0,25) \times 10^8$	$(0,38 \pm 0,14) \times 10^7$	> 95
		75 %	$(2,10^{\wedge} \pm 0,50) \times 10^8$	$(0,18 \pm 0,04) \times 10^7$	> 98
	Бакт. взвесь без носителя (контроль)	–	$(2,65 \pm 0,46) \times 10^8$	–	–

Примечание:

- * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем;
- \wedge – $p < 0,05$ по сравнению с 50 %-м сорбентом.

В образцах взвесей лактобактерий, иммобилизованных с использованием гомогената с концентрацией 75 %, отмечен достоверно более низкий показатель КОЕ/мл и более низкая полнота иммобилизации клеток по сравнению с 50 %-м сорбентом. В образцах взвесей иммобилизованных бифидобактерий в показателе

КОЕ/мл не отмечено достоверных изменений по сравнению с исходной культурой. Полнота связывания клеток бифидобактерий во всех случаях составила более 95 %, наиболее высокий процент иммобилизации отмечен при использовании гомогената с концентрацией 75 %. Полученные результаты свидетельствуют о большей эффективности сорбции у носителя на основе гомогената бурых водорослей с концентрацией 50 % для лактобактерий и с концентрацией 75 % для бифидобактерий. Указанное различие связано, вероятно, с исходной концентрацией клеток в бактериальной взвеси.

Далее в работе были апробированы другие варианты сорбентов для иммобилизации клеток: ламинария и фукус в виде лиофилизированного порошка, слоевища ламинарии и фукуса измельченные, альгинат натрия, отруби ферментированные, клетчатка, семена льна, лигнин гидролизный (полифепан), МКЦ, крахмал прежелатинизированный.

Перед приготовлением рабочего разведения сорбент при необходимости предварительно измельчали до порошкообразного состояния. Для сорбентов, образующих гель при добавлении воды, подобрана оптимальная концентрация 1–4 % (альгинат натрия, ламинария и фукус лиофилизированные, семена льна, крахмал прежелатинизированный), обеспечивающая необходимые физические и технологические свойства рабочего разведения. Для измельченных слоевищ ламинарии и фукуса, отрубей, клетчатки и лигнина гидролизного более подходящими были признаны разведения с концентрацией 5–10 %.

Высокая сорбционная способность является необходимым технологическим свойством для апробируемых носителей, предназначенных для иммобилизации бактериальных клеток. Этот параметр может служить одним из дифференциальных критериев при оценке потенциальной пригодности сорбента для использования в производстве пробиотических препаратов.

Полученные результаты апробации сорбентов на модели иммобилизованных бифидо- и лактобактерий свидетельствуют о высокой эффективности всех использованных сорбентов – полнота иммобилизации составила более 90 % (табл. 2, 3).

Таблица 2 – Иммобилизация бифидобактерий

№ варианта	Сорбент	Концентрация сорбента в рабочем разведении	КОЕ/мл		Полнота иммобилизации, %
			взвесь иммобилизованных клеток <i>B. bifidum</i> 1	надосадочная жидкость	
1	Ламинария лиофилизированная	2 %	$2,35 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
2	Ламинарии слоевища измельченные	5 %	$1,93 \times 10^8$	$0,02 \times 10^8$	> 98
3	Фукус лиофилизированный	2 %	$2,35 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
4	Фукуса слоевища измельченные	5 %	$2,25 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
5	Альгинат натрия	1 %	$2,03 \times 10^8$	$0,15 \times 10^8$	> 90
6	Отруби ферментированные	5 %	$2,43 \times 10^8$	$0,09 \times 10^8$	> 95
7	Клетчатка	5 %	$2,43 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
8	Семена льна	4 %	$2,58 \times 10^8$	$0,12 \times 10^8$	> 95
9	Лигнин гидролизный (полифепан)	10 %	$2,10 \times 10^8$	$0,07 \times 10^8$	> 95
10	Крахмал прежелатинизированный	4 %	$2,28 \times 10^8$	$0,16 \times 10^8$	> 90
11	Бакт. взвесь без сорбента (контроль)	–	$2,85 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	–

Для иммобилизации лактобактерий были апробированы сорбенты, представленные в таблице 3.

Таблица 3 – Иммобилизация лактобактерий

№ варианта	Сорбент	Концентрация сорбента в рабочем разведении	КОЕ/мл		Полнота иммобилизации, %
			взвесь иммобилизованных клеток <i>L. plantarum</i> 8P-A3	надосадочная жидкость	
1	Ламинария лиофилизированная	2,5 %	$5,60 \times 10^9$	$1,75 \times 10^8$	> 95
2	Ламинарии слоевища измельченные	5 %	$4,30 \times 10^9$	$0,93 \times 10^8$	> 95
3	Фукус лиофилизированный	5 %	$5,35 \times 10^9$	$1,05 \times 10^8$	> 98
4	Альгинат натрия	2,5 %	$4,25 \times 10^9$	$2,00 \times 10^8$	> 95
5	Отруби ферментированные	5 %	$5,03 \times 10^9$	$0,95 \times 10^8$	> 98
6	Лигнин гидролизный (полифепан)	10 %	$5,40 \times 10^9$	$0,65 \times 10^8$	> 98
7	МКЦ	15 %	$4,45 \times 10^9$	$1,00 \times 10^8$	> 95
8	Бакт. взвесь без сорбента (контроль)	–	$5,80 \times 10^9$	$1,90 \times 10^9$	–

Анализ результатов контроля полноты сорбции носителей на модели иммобилизованных бифидо- и лактобактерий показал, что для бифидобактерий наиболее эффективными являются сорбенты на основе бурых водорослей и клетчатки, для лактобактерий – фукус лиофилизированный, отруби ферментированные и лигнин гидролизный (полифепан).

3.2 Исследование устойчивости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий к действию кислого раствора пепсина

При разработке лекарственных форм пробиотических препаратов важное значение имеет выявление чувствительности живых микроорганизмов к неблагоприятным условиям ЖКТ человека. С этой целью были проведены предварительные исследования устойчивости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий к действию кислого раствора пепсина, имитирующего желудочный сок человека. Для этого взвесь адсорбированных клеток инкубировали при (37 ± 1) °С в кислом растворе пепсина в течение 30 мин. Для сравнения использовали нативную взвесь бифидо- и лактобактерий.

Количество жизнеспособных клеток бифидо- и лактобактерий в образцах перед началом испытания составляло не менее 10^8 КОЕ/мл и 10^9 КОЕ/мл соответственно. После инкубации в кислом растворе пепсина отмечено снижение выживаемости клеток в разной степени во всех экспериментальных образцах. В культурах бифидобактерий, содержащих в качестве сорбента альгинат натрия, отруби ферментированные, и в контрольном варианте отмечено снижение показателя КОЕ/мл на 5–6 порядков. Данные сорбенты не оказывают выраженного защитного эффекта в создаваемых неблагоприятных условиях в отношении бифидобактерий. Наибольшую устойчивость показали образцы, содержащие носители на основе ламинарии и фукуса, в меньшей степени защитный эффект оказали сорбенты на основе клетчатки, семян льна, лигнина гидролизного и крахмала прежелатинизированного (рис. 1).

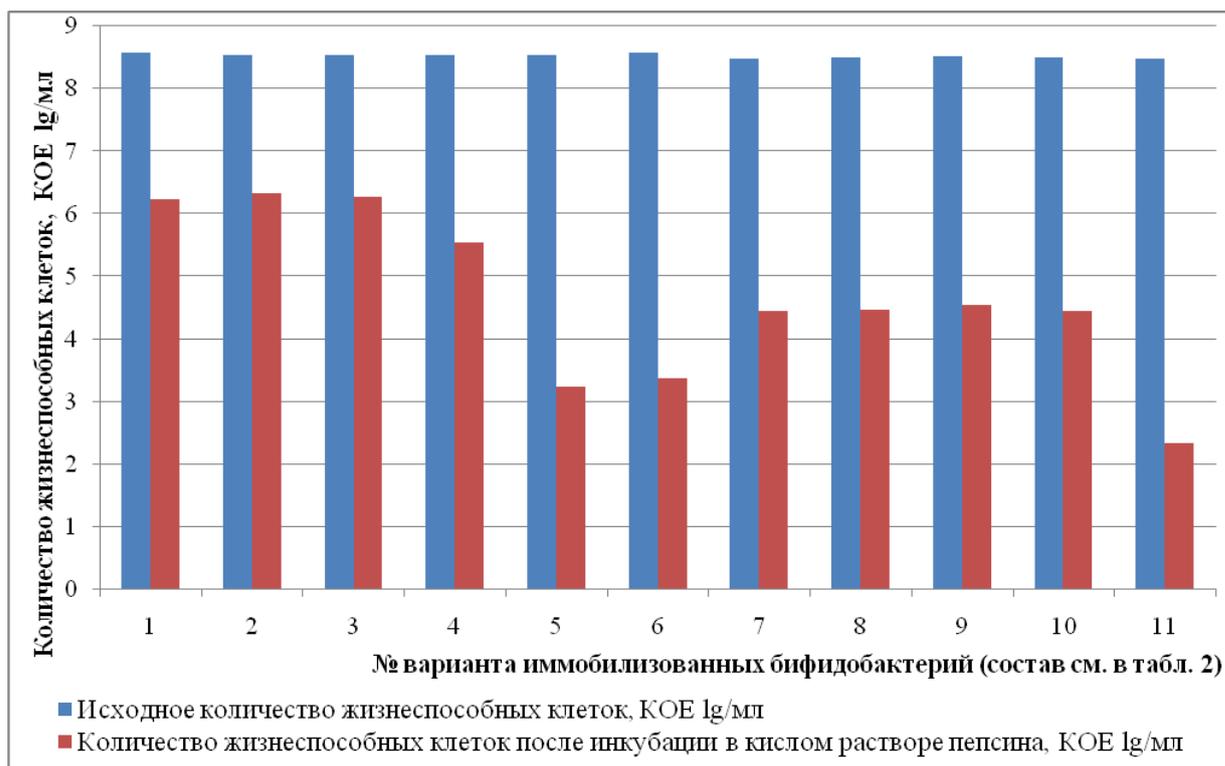


Рисунок 1 – Чувствительность бифидобактерий к действию кислого раствора пепсина

Результаты контроля чувствительности лактобактерий к действию кислого раствора пепсина представлены на рисунке 2.

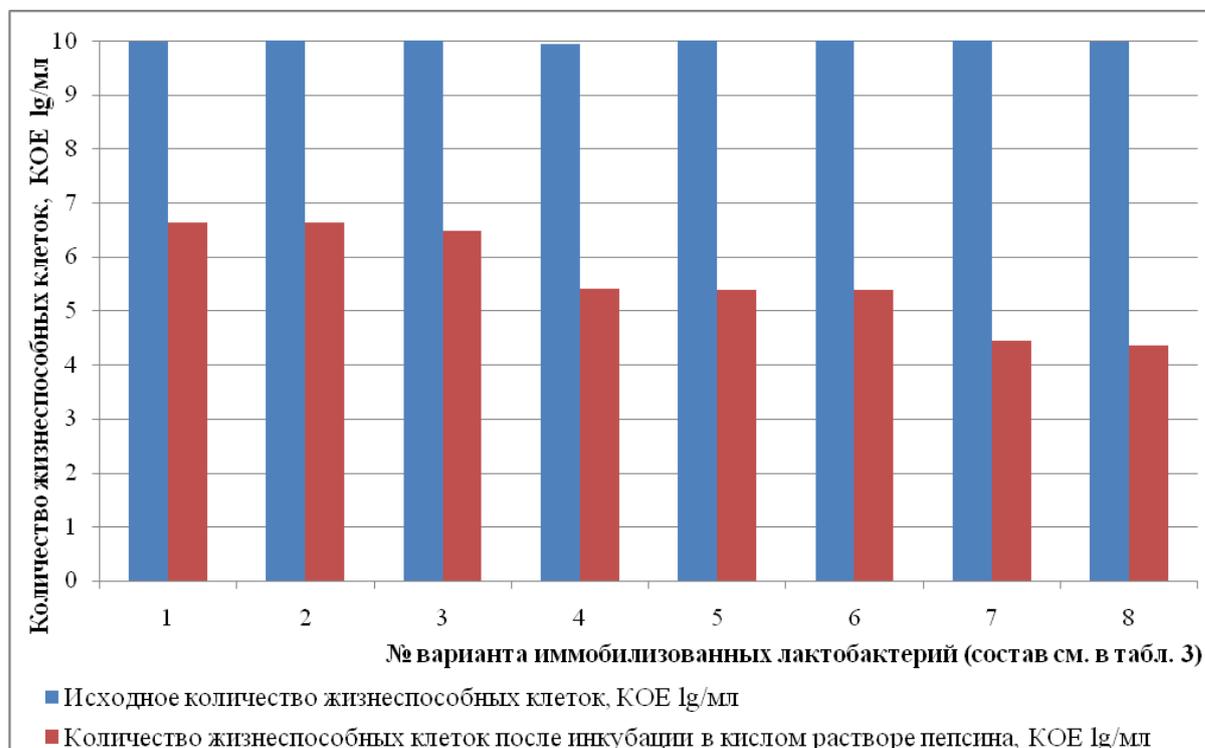


Рисунок 2 – Чувствительность лактобактерий к действию кислого раствора пепсина

В образцах лактобактерий с сорбентами на основе бурых водорослей также отмечено максимальное сохранение жизнеспособных клеток. Несколько уступают защитные свойства альгината натрия, лигнина гидролизного, отрубей ферментированных. Максимальная чувствительность к действию кислого раствора пепсина отмечена в вариантах с МКЦ и в контроле – показатель КОЕ/мл снизился на 6 порядков по сравнению с исходным значением.

Таким образом, предварительные исследования защитных свойств сорбентов показали, что выраженный протективный эффект на модели бифидо- и лактобактерий обеспечивают сорбенты на основе гомогената бурых водорослей. Данные сорбенты, а также, но в меньшей степени, клетчатка, лигнин гидролизный (полифепан), семена льна и крахмал были признаны перспективными для дальнейшей разработки пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток.

3.3 Влияние иммобилизации на стабильность лиофилизированных культур

Для стабилизации бактериальных культур в производстве пробиотиков применяют лиофильное высушивание, обеспечивающее сохранение их жизнеспособности и биологической активности на протяжении регламентированного срока годности препарата. Для защиты клеток от неблагоприятного воздействия замораживания и обезвоживания, а также для получения необходимой структуры сухой биомассы применяют различные защитные среды. Эти среды должны обеспечивать био- и структуропротективный эффект, позволяющий получать препараты, отвечающие регламентированным требованиям по биологическим и физическим свойствам. Общепринятым протектором в производстве бифидум- и лактобактерина является СЖМ среда. С целью изучения структурообразующих и защитных свойства сорбентов на основе бурых водорослей при лиофилизации были получены образцы бифидо- и лактобактерий, иммобилизованных на гомогенате водорослей, в форме

лиофилизированной биомассы во флаконе (традиционная лекарственная форма в производстве пробиотиков).

Стерильные рабочие разведения носителей, приготовленные на основе желированного продукта (гомогенат фукуса и ламинарии), смешивали с взвесью бифидо- и лактобактерий в соотношении 1:2 соответственно и разливали во флаконы ФИ-5 по $(2,0 \pm 0,1)$ мл в двух вариантах – с добавлением защитной СЖМ среды в количестве 25 % (для бифидобактерий), 30 % (для лактобактерий) и без нее для изучения протективных и структурообразующих свойств носителей. В качестве контроля выступала нативная бактериальная взвесь бифидо- и лактобактерий. На стадии лиофилизации препарата был применен режим замораживания и высушивания, используемый в производстве бифидум- и лактобактерина. Состав образцов бифидо- и лактобактерий в форме лиофилизированной биомассы во флаконе представлен в таблицах 4, 5.

Таблица 4 – Состав образцов бифидобактерий

№ состава	Сорбент	Защитная среда	Соотношение иммобилизованная взвесь: защитная среда, части/г	Соотношение компонентов защитной среды, части/г	
				Обрат молока	СЖ
1	Фукус	СЖМ	9:3	2	1
2		–	–	–	–
3	Ламинария	СЖМ	9:3	2	1
4		–	–	–	–
5	Бакт.взвесь без сорбента (контроль)	СЖМ	9:3	2	1
6		–	–	–	–

Таблица 5 – Состав образцов лактобактерий

№ состава	Сорбент	Защитная среда	Соотношение иммобилизованная взвесь: защитная среда, части/г	Соотношение компонентов защитной среды, части/г	
				Обрат молока	СЖ
1	Фукус	СЖМ	9:4	2	2
2		–	–	–	–
3	Ламинария	СЖМ	9:4	2	2
4		–	–	–	–
5	Бакт. взвесь без сорбента (контроль)	СЖМ	9:4	2	2
6		–	–	–	–

Анализ лиофилизированной биомассы бифидо- и лактобактерий во флаконах в составах № 1–5 показал, что указанный режим сублимации позволяет получать сухой препарат, который по своим физическим свойствам (внешний вид, структура, время восстановления) не отличается от аналогичных параметров коммерческих бифидум- и лактобактерина. Исключение составил вариант № 6 (неиммобилизованные клетки без добавления среды СЖМ) – форма и структура биомассы во флаконе («таблетки») были неудовлетворительными.

Образцы были заложены на хранение при температуре (5 ± 3) °С и подвергались ежеквартальному контролю биологических и физических свойств.

Результаты периодического контроля иммобилизованных бифидобактерий (лиофилизат во флаконе) представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Лиофилизированная биомасса бифидобактерий во флаконе

№ состава	Сорбент	Защитная среда	рН				КОЕ/мл, $\times 10^7$				Активность кислотообразования, °Т			
			исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	Фукус	СЖМ	6,16	6,19	6,21	6,13	6,25 $\pm 1,49$	3,40 $\pm 0,31$	3,00 $\pm 0,58^*$	2,33 $\pm 0,33^*$	120,6	122,0	121,0	120,0
2		·	6,22	6,20	6,32	6,40	6,00 $\pm 0,58^\#$	2,12 $\pm 0,39^{*\#}$	2,75 $\pm 0,63^*$	0,80 $\pm 0,17^{*\#}$	132,0	121,0	123,0	122,0
3	Ламинария	СЖМ	6,31	6,32	6,19	6,07	6,50 $\pm 1,41$	5,67 $\pm 1,45$	3,63 $\pm 0,85$	2,83 $\pm 0,73^*$	130,0	126,0	124,0	121,0
4		·	6,25	6,15	6,14	6,15	5,20 $\pm 0,58^\#$	3,33 $\pm 0,67^*$	2,30 $\pm 0,24^*$	1,15 $\pm 0,35^{*\#}$	136,1	118,0	120,0	120,0
5	Контроль (бакт. взвесь)	СЖМ	6,29	6,30	6,24	6,20	7,86 $\pm 0,46$	5,25 $\pm 1,31$	3,65 $\pm 1,48^*$	2,75 $\pm 0,63^*$	141,2	138,0	126,0	125,0
6		·	6,24	6,09	6,00	5,87	7,25 $\pm 1,31$	4,00 $\pm 0,41^*$	1,28 $\pm 0,19^\#$	0,60 $\pm 0,15^{*\#}$	139,2	126,0	126,0	115,0

Примечание:

- * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением;
- ^\# – $p < 0,05$ по сравнению с контролем со средой СЖМ.

Во всех образцах уровень активности кислотообразования составлял не ниже 90 °Т, значение рН сохранялось в допустимых пределах (5,5–6,5), количество жизнеспособных бифидобактерий составляло не менее 10^7 КОЕ/мл, за исключением образцов № 2 и № 6 (составы без добавления СЖМ среды). В

образцах без защитной среды показатель КОЕ/мл был достоверно ниже по сравнению с контролем. Уже после 6 мес хранения отмечается достоверное снижение выживаемости по сравнению с исходным значением в образцах иммобилизованных бифидобактерий без СЖМ среды (№ 2, 4, 6), после 12 мес – в образцах состава № 1 (иммобилизованные клетки на фукусе) и № 5 (неиммобилизованные клетки), после 18 мес – в составе № 3 (иммобилизованные клетки на ламинарии). Таким образом, сорбент на основе ламинарии обеспечивает более длительную стабильность показателя выживаемости по сравнению с контрольным составом.

Результаты периодического контроля иммобилизованных лактобактерий (лиофилизат во флаконе) представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Лиофилизированная биомасса лактобактерий во флаконе

№ состава	Сорбент	Защитная среда	рН				КОЕ/мл, $\times 10^9$				Активность кислотообразования, °Т			
			исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	Фукус	СЖМ	5,58	5,36	5,42	5,07	1,22 $\pm 0,30$	1,13 $\pm 0,47$	0,92 $\pm 0,22$	0,75 $\pm 0,09$	284,0	274,0	258,1	252,5
2		'	5,32	5,25	5,34	5,20	0,33 $\pm 0,03^\#$	0,25 $\pm 0,03^\#$	0,23 $\pm 0,12^\#$	0,25 $\pm 0,05^\#$	263,0	260,0	244,9	239,4
3	Ламинария	СЖМ	5,66	5,47	5,56	5,24	1,32 $\pm 0,17$	1,18 $\pm 0,13$	0,90 $\pm 0,06^{* \#}$	0,62 $\pm 0,25^*$	284,0	270,0	251,0	247,5
4		'	5,29	5,00	5,12	4,90	0,26 $\pm 0,02^\#$	0,09 $\pm 0,06^{* \#}$	0,06 $\pm 0,01^{* \#}$	0,06 $\pm 0,01^{* \#}$	265,0	254,0	252,0	242,4
5	Контроль (бакт. взвесь)	СЖМ	5,48	5,46	5,49	5,47	1,73 $\pm 0,17$	1,83 $\pm 0,60$	1,08 $\pm 0,05^*$	0,93 $\pm 0,05^*$	295,0	284,0	251,0	246,5
6		'	4,94	4,80	4,76	4,69	0,95 $\pm 0,05^\#$	0,12 $\pm 0,04^{* \#}$	0,08 $\pm 0,02^{* \#}$	0,05 $\pm 0,01^{* \#}$	264,0	245,0	251,1	247,5

Примечание:

- * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением;
- ^\# – $p < 0,05$ по сравнению с контролем со средой СЖМ.

В составах лактобактерий № 4, 6 (без СЖМ среды) после 6 мес наблюдения отмечено достоверное снижение показателя КОЕ/мл по сравнению с исходным значением, после 12 мес – в образцах составов № 3, 5 (иммобилизованные клетки на ламинарии и контроль со средой СЖМ). После 18 мес хранения отмечена

стабильность показателя КОЕ/мл лактобактерий, иммобилизованных на фукусе (состав № 1, 2). Во всех образцах активность кислотообразования сохранялась на уровне не ниже 200 °Т, значение рН было в допустимых пределах (4,5–6,0).

Несмотря на то, что физические свойства «таблетки» образцов иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, лиофилизированных без добавления защитной среды СЖМ, не отличались от контроля со средой СЖМ, показатели выживаемости клеток были достоверно ниже, чем в контрольных образцах с неиммобилизованными клетками с добавлением данной защитной среды (табл. 6, 7). Таким образом, сорбенты на основе бурых водорослей обладают структурообразующими свойствами и не оказывают негативного влияния на физические свойства лиофилизированной биомассы во флаконе, однако, без добавления защитной среды СЖМ гомогенат бурых водорослей не обеспечивает необходимого сохранения жизнеспособности клеток в процессе лиофилизации и хранения препарата.

С целью изучения протективных и структурообразующих свойств коллагенового белка были получены экспериментальные образцы лактобактерий, иммобилизованных на коротковолокнистом коллагене, в форме лиофилизата во флаконе. Гель концентрации 1 % и 5 % стерилизовали и смешивали с взвесью лактобактерий в соотношении 1:1 и 1:2 соответственно. Полученные взвеси разливали во флаконы ФИ-5 по (2,0±0,1) мл в двух вариантах – с добавлением защитной СЖМ среды и без нее, и подвергали лиофильному высушиванию по режиму лактобактерина. После лиофилизации в составах № 5, 6, 7, 8, 10 структура сухой биомассы во флаконе не соответствовала регламентированным требованиям для данной лекарственной формы лактобактерина – «таблетка» была сильно деформирована. Таким образом, коллаген в концентрации 5 % нецелесообразно использовать для получения иммобилизованных клеток в форме лиофилизата во флаконе.

После 18 мес хранения во всех образцах уровень активности кислотообразования был не ниже 200 °Т, значение рН сохранялось в допустимых пределах (4,5–6,0). После 18 мес хранения достоверное снижение показателя

КОЕ/мл отмечено практически во всех составах, кроме № 1 (1 % коллаген в соотношении с бактериальной взвесью 1:1), № 5 и № 8 (5 % коллаген), однако форма и структура «таблетки» в двух последних составах была неудовлетворительной (табл. 8).

Таблица 8 – Лиофилизированная биомасса лактобактерий во флаконе

№ состава	Концентрация коллагена	Соотношение коллаген / бакт. взвесь	Защитная среда	рН				КОЕ/мл, $\times 10^9$				Активность кислотообразования, °Т			
				исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	1%	1:1	СЖМ	5,59	5,28	5,32	5,63	1,65 $\pm 0,35$	1,07 $\pm 0,12$	1,23 $\pm 0,30$	0,95 $\pm 0,05$	259,0	240,0	237,0	238,2
2			-	5,12	5,09	5,29	5,13	0,75 $\pm 0,25$	0,70 $\pm 0,20$	0,23 $\pm 0,06^*$	0,13 $\pm 0,08^*$	253,0	236,0	241,0	240,2
3		1:2	СЖМ	5,58	5,25	5,43	5,73	2,50 $\pm 0,50$	2,17 $\pm 0,44$	1,23 $\pm 0,25^*$	1,10 $\pm 0,10^*$	252,0	248,0	238,0	237,2
4			-	5,14	5,09	5,10	5,08	1,20 $\pm 0,20$	0,55 $\pm 0,05$	0,55 $\pm 0,05^*$	0,25 $\pm 0,05^*$	253,0	240,0	243,0	246,2
5	5%	1:1	СЖМ	5,48	5,30	5,67	5,58	0,65 $\pm 0,35$	0,57 $\pm 0,23$	0,53 $\pm 0,24$	0,11 $\pm 0,01$	237,0	235,0	242,0	236,2
6			-	5,59	5,56	5,54	5,78	1,60 $\pm 0,40$	0,73 $\pm 0,22$	0,78 $\pm 0,13$	0,12 $\pm 0,02^*$	250,0	223,0	239,0	229,1
7		1:2	СЖМ	5,72	5,37	5,82	5,77	1,75 $\pm 0,25$	1,17 $\pm 0,44$	0,77 $\pm 0,15^*$	0,65 $\pm 0,35^*$	256,0	234,0	246,0	244,2
8			-	5,36	5,24	5,32	5,35	1,40 $\pm 0,60$	0,70 $\pm 0,10$	0,77 $\pm 0,12$	0,25 $\pm 0,05$	240,0	240,0	242,0	242,2
9	Контроль (бакт. взвесь)		СЖМ	5,55	5,30	5,66	5,73	2,50 $\pm 0,50$	1,85 $\pm 0,10$	1,20 $\pm 0,14^*$	1,15 $\pm 0,15^*$	265,0	243,0	247,0	238,2
10			-	4,88	4,74	4,81	4,82	3,10 $\pm 0,10$	0,70 $\pm 0,15^*$	0,70 $\pm 0,10^*$	0,19 $\pm 0,01^*$	260,0	235,0	250,0	235,2

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением.

Таким образом, установлено, что на формирование «таблетки» во флаконе прямое влияние оказывает концентрация и количество коллагена в составе рабочего разведения носителя. Лучшей признана концентрация коллагена 1 %, а соотношение с бактериальной взвесью – 1:1. Однако, этот вариант значительно уступает качеству образцов препарата, полученного с использованием сорбента на основе бурых водорослей.

По совокупности результатов исследований биологических и технологических свойств носителей можно сделать вывод, что апробированные сорбенты обеспечивают высокий процент иммобилизации клеток (более 90), но при этом они в различной степени оказывают защитный эффект в отношении бифидо- и лактобактерий в присутствии кислого раствора пепсина, а также структурирующий эффект при лиофилизации бактериальных культур во флаконах. Полученные данные позволяют рассматривать сорбенты на основе бурых водорослей как наиболее перспективные для иммобилизации пробиотических клеток и для разработки лекарственных форм пробиотических препаратов на их основе. Учитывая то, что выпуск пробиотиков в виде сухой биомассы во флаконах не отвечает современным требованиям рынка лекарственных средств, улучшение потребительских свойств отечественных пробиотических препаратов связано с переходом на выпуск этих препаратов в виде капсул.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУХОЙ БИОМАССЫ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ

В процессе организации выпуска пробиотических препаратов в виде капсул возникает ряд технологических проблем, связанных с высокой гигроскопичностью и низким показателем сыпучести сухой биомассы бифидо- и лактобактерий. Известно, что гигроскопичность и сыпучесть лиофильно высушенной биомассы бактерий зависят от многих факторов и в значительной степени определяются видом и количеством ксеропротекторов, вводимых в состав бактериальной суспензии до лиофилизации.

Задача данного этапа исследований включала наработку образцов сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, изучение влияния иммобилизации клеток на процесс их лиофилизации, исследование физико-химических, биологических и технологических свойств лиофилизированной биомассы, стабильности ее параметров в процессе хранения. Данная биомасса предназначена для получения капсулированной лекарственной формы пробиотиков.

4.1 Оценка физико-химических и биологических свойств сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий

В качестве сорбента для иммобилизации бифидобактерий использовали гомогенат ламинарии (составы Л1–Л4) и гомогенат фукуса (составы Ф1, Ф2), приготовленные на основе желированного диетического продукта. В асептических условиях сорбент вносили в бактериальную взвесь в соотношении 1:2 (сорбент/взвесь) и перемешивали в течение 30 мин.

Для лиофилизации взвеси иммобилизованных бифидобактерий использовали СЖМ среду в следующих соотношениях: 9 частей иммобилизованной бактериальной взвеси, 2 части обрат молока, 1 часть сахарозо-желатиновой (СЖ) среды. Также были апробированы экспериментальные защитные среды, не содержащие дорогостоящий компонент желатин – сахарозо-молочную (СМ) и защитные среды на основе сахарозы, коротковолокнистого коллагена (СК-1) и коллагена (СК-2). Полученную суспензию иммобилизованных бифидобактерий в асептических условиях разливали в металлические кассеты по $(0,55 \pm 0,05)$ л, чтобы высота слоя жидкости составляла не более 15 мм и подвергали лиофильному высушиванию по регламентированному режиму бифидумбактерина во флаконах. Сухую биомассу извлекали из кассет и измельчали с помощью сита с ячейками на 0,5 мм. Сухую биомассу хранили при температуре (5 ± 3) °С в герметично закрытых пластиковых контейнерах и проводили периодический контроль физико-химических, биологических и технологических свойств. В качестве объекта сравнения (контроль) использовали сухую микробную массу бифидобактерий, полученную с использованием среды СЖМ. Состав защитных сред и их биопротективный эффект представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Состав и эффективность защитных сред для лиофилизации иммобилизованных бифидобактерий

Образец бактериальной взвеси	Защитная среда	Соотношение иммобилизованная взвесь: защитная среда, части	Соотношение компонентов защитной среды, части					Биопротективный эффект, % сохранения жизнеспособных клеток
			Обрат молока	СЖ	Сахароза	СК-1	СК-2	
Л1	СЖМ	9:3	2	1	–	–	–	> 50
Л2	СМ	9:3	2	–	1	–	–	> 50
Л3	СК-1	9:3	–	–	–	3	–	< 20
Л4	СК-2	9:3	–	–	–	–	3	< 20
Ф1	СЖМ	9:3	2	1	–	–	–	> 50
Ф2	СМ	9:3	2	–	1	–	–	> 50
Контроль	СЖМ	9:3	2	1	–	–	–	> 50

Результаты апробации показали, что варианты защитных сред с применением коллагена не оказывали выраженного протективного действия и не обеспечивали необходимый уровень выживаемости клеток. Биопротективный эффект защитных сред на основе сахарозы и коллагена оказался ниже 20 %, что в значительной степени уступает образцам с СЖМ и СМ защитными средами. Поэтому, применение коллагена в качестве компонента защитной среды было признано нецелесообразным. Сохраняемость жизнеспособных клеток в образцах иммобилизованных бифидобактерий с применением сорбента на основе бурых водорослей и в контроле с защитными СЖМ и СМ средами была выше 50 %.

Результаты периодического контроля сухой биомассы иммобилизованных бифидобактерий представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Параметры сухой биомассы бифидобактерий в процессе хранения

№ состава биомассы	Защитная среда	рН				КОЕ/0,2 г, $\times 10^8$				Активность кислотообразования, °Т			
		исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
Л1	СЖМ	5,89	5,98	5,89	5,68	2,18 $\pm 0,34$	1,73 $\pm 0,45$	1,58 $\pm 0,23$	1,50 $\pm 0,29$	148,0	122,4	116,2	117,6
Л2	СМ	5,86	5,99	5,82	5,88	2,48 $\pm 0,25$	2,15 $\pm 0,41^{\#}$	1,74 $\pm 0,19^{*\#}$	0,90 $\pm 0,07^*$	150,0	125,0	115,8	115,6
Л3	СК-1	5,62	5,60	5,65	5,52	0,26 $\pm 0,06^{\#}$	0,09 $\pm 0,01^{*\#}$	0,11 $\pm 0,05^{\#}$	0,13 $\pm 0,03^{\#}$	138,0	113,0	108,4	117,6
Л4	СК-2	5,54	5,59	5,59	5,63	0,53 $\pm 0,14^{\#}$	0,24 $\pm 0,05^{\#}$	0,29 $\pm 0,10^{\#}$	0,17 $\pm 0,02^{*\#}$	145,0	115,0	111,6	113,7
Ф1	СЖМ	6,02	6,12	5,96	5,98	2,03 $\pm 0,30$	1,48 $\pm 0,23$	1,78 $\pm 0,27$	1,18 $\pm 0,12^*$	127,3	132,2	122,7	120,0
Ф2	СМ	6,08	6,04	6,00	5,70	2,13 $\pm 0,21$	1,70 $\pm 0,24$	1,44 $\pm 0,16^*$	0,96 $\pm 0,07^*$	125,6	126,2	120,9	120,0
Контроль	СЖМ	6,28	6,28	6,12	5,80	3,08 $\pm 0,43$	2,28 $\pm 0,63$	1,20 $\pm 0,12^*$	0,98 $\pm 0,17^*$	126,8	118,4	105,7	110,0

Примечания:

- * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением;
- # – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

На протяжении 18 мес хранения во всех образцах уровень активности кислотообразования составлял не ниже 90 °Т, значение рН определялось в допустимых пределах (5,5–6,5). В составах с применением защитных сред на

основе сахарозы и коллагена (Л3, Л4) исходные значения показателя КОЕ были статистически значимо ниже, чем в контрольном варианте. В составах Л2, Ф2 (с СМ защитной средой) и в контроле после 12 мес хранения отмечено статистически значимое снижение показателя выживаемости по сравнению с исходным значением, после 18 мес показатель КОЕ ниже 10^8 КОЕ/0,2 г. Это позволяет сделать вывод, что защитная среда на основе сахарозы и молока без желатинового компонента не обеспечивает стабильности показателя КОЕ в лиофилизированной биомассе во время хранения. В составах биомассы с сорбентами на основе гомогената ламинарии и фукуса (Л1 и Ф1) с добавлением СЖМ среды показатель выживаемости сохраняется стабильный показатель выживаемости на уровне не менее 10^8 КОЕ/0,2 г на протяжении всего срока хранения биомассы.

В дальнейшей работе для иммобилизации бифидобактерий были апробированы следующие варианты сорбентов: гомогенат бурых водорослей, приготовленный из лиофилизированного порошка и термически высушенных измельченных слоевищ (фукус, ламинария), альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные, клетчатка, семена льна, лигнин гидролизный (полифепан), крахмал прежелатинизированный. Приготовление рабочих рзведений сорбентов и взвеси иммобилизованных клеток описано в главе 3. Для лиофилизации иммобилизованной бактериальной взвеси использовали СЖМ среду высушивания в количестве 25 %. В качестве контроля использовали сухую микробную массу бифидобактерий, полученную с использованием СЖМ среды.

В течение 18 мес активность кислотообразования бифидобактерий сохранялась на уровне, превышающем 90 °Т, значение рН определялось в допустимых пределах (5,5–6,5). Однако, апробированные сорбенты в разной степени оказывают влияние на выживаемость клеток. Количество жизнеспособных бифидобактерий в составах с сорбентом на основе бурых водорослей, отрубей, клетчатки, лигнина гидролизного и в контрольном варианте составляло не менее 10^8 КОЕ/0,2 г биомассы после 18 мес. В соствах биомассы, в которых в качестве сорбента применяли отруби пшеничные ферментированные, семена льна и крахмал, отмечено статистически значимое снижение показателя

выживаемости после 6 мес хранения. После 12 мес хранения статистически значимое снижение показателя КОЕ отмечено в составах с альгинатом натрия, клетчаткой, лигнином гидролизным и в контроле. Стоит отметить, что в составах, содержащих в качестве сорбента бурые водоросли, показатель выживаемости статистически значимо снижается по сравнению с исходным значением после 18 мес хранения биомассы, тогда как в контрольном составе показатель КОЕ достоверно снижается после 12 мес хранения. Таким образом, сорбент на основе бурых водорослей обеспечивает более длительную стабильность показателя выживаемости бифидобактерий (табл. 11).

Таблица 11 – Параметры сухой биомассы бифидобактерий в процессе хранения

№ состава биомассы	Сорбент	рН				КОЕ/0,2 гр, $\times 10^8$				Активность кислотообразования, °Т			
		исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	Ламинария лиофилизированная	6,31	6,18	6,13	6,04	2,43 $\pm 0,23$	2,38 $\pm 0,53$	1,94 $\pm 0,09$	1,40 $\pm 0,20^*$	139,0	115,5	115,0	113,0
2	Ламинарии слоевища измельченные	6,32	6,26	6,22	6,12	2,60 $\pm 0,35$	2,03 $\pm 0,08$	1,92 $\pm 0,05$	1,04 $\pm 0,09^*$	149,5	120,0	122,0	120,0
3	Фукус лиофилизированный	6,31	6,20	6,19	6,15	2,50 $\pm 0,21$	2,26 $\pm 0,20$	2,02 $\pm 0,14$	1,26 $\pm 0,19^*$	147,6	116,5	112,0	110,0
4	Фукуса слоевища измельченные	6,27	6,17	6,13	6,00	2,35 $\pm 0,53$	1,88 $\pm 0,45$	1,62 $\pm 0,17$	1,12 $\pm 0,18^*$	144,8	114,6	115,0	113,0
5	Альгинат натрия	6,23	6,25	6,24	6,10	2,53 $\pm 0,28$	2,43 $\pm 0,23$	1,45 $\pm 0,17^*$	0,88 $\pm 0,14^{\#}$	132,4	117,1	109,0	110,0
6	Отруби ферментированные	6,31	6,20	6,19	6,14	2,15 $\pm 0,17$	1,40 $\pm 0,16^{\#}$	1,17 $\pm 0,19^{\#}$	1,00 $\pm 0,06^{\#}$	138,1	100,9	112,0	108,0
7	Клетчатка	6,32	6,25	6,24	6,10	2,28 $\pm 0,19$	1,98 $\pm 0,10$	1,45 $\pm 0,17^*$	1,00 $\pm 0,14^*$	139,0	111,6	110,0	105,0
8	Семена льна	6,25	6,22	6,23	6,05	2,48 $\pm 0,21$	1,76 $\pm 0,17^{\#}$	1,08 $\pm 0,11^{\#}$	0,86 $\pm 0,07^{\#}$	138,1	112,7	118,0	114,0
9	Лигнин гидролизный (полифепан)	6,11	5,99	5,99	5,80	2,48 $\pm 0,21$	2,08 $\pm 0,05$	1,65 $\pm 0,16^*$	1,02 $\pm 0,07^*$	140,0	115,1	120,0	115,0
10	Крахмал прежелатинизированный	6,16	6,19	6,15	6,10	2,25 $\pm 0,19$	1,55 $\pm 0,22^{\#}$	1,25 $\pm 0,07^{\#}$	0,93 $\pm 0,11^{\#}$	137,1	104,8	115,0	114,0
11	Контроль	6,10	6,08	6,01	6,00	2,83 $\pm 0,51$	2,78 $\pm 0,48$	1,77 $\pm 0,11^*$	1,42 $\pm 0,19^*$	143,4	142,1	142,0	124,0

Примечания:

- * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением;
- # – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

На модели сухой биомассы лактобактерий апробированы следующие носители – гомогенат бурых водорослей (фукус, ламинария), альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные, лигнин гидролизный (полифепан), МКЦ. Для лиофилизации иммобилизованной бактериальной взвеси использовали СЖМ среду высушивания в следующих соотношениях: 9 частей иммобилизованной бактериальной взвеси, 2 части обратного молока, 2 части СЖ среды. Бактериальную суспензию разливали в металлические кассеты по (0,55±0,05) л и подвергали лиофильному высушиванию. В качестве контроля использовали сухую микробную массу лактобактерий, полученную с применением СЖМ среды.

Результаты периодического контроля сухой биомассы иммобилизованных лактобактерий приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Параметры сухой биомассы лактобактерий в процессе хранения

№ состава биомассы	Сорбент	рН				КОЕ/0,2 гр, ×10 ⁹				Активность кислотообразования, °Т			
		исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	Ламинария лиофилизируемая	5,52	5,35	5,31	5,20	3,23 ±0,89	2,68 ±0,26	2,12 ±0,08	1,82 ±0,14*	241,2	240,0	240,0	224,0
2	Ламинарии слоевища измельченные	5,43	5,31	5,40	5,32	3,95 ±0,85	3,18 ±0,09	2,25 ±0,12	1,70 ±0,16*	241,2	240,0	238,0	230,0
3	Фукус лиофилизируемый	5,44	5,31	5,30	5,27	3,67 ±0,38	2,77 ±0,25	2,75 ±0,31	1,89 ±0,12*	243,3	242,0	238,0	234,0
4	Альгинат натрия	5,40	5,30	5,24	5,20	4,12 ±0,38	2,53 ±0,26* [#]	1,93 ±0,08* [#]	1,28 ±0,18* [#]	247,4	243,0	240,0	235,0
5	Отруби пшеничные ферментированные	5,45	5,40	5,40	5,24	3,43 ±0,15	2,95 ±0,19	2,20 ±0,08*	1,67 ±0,11*	245,3	240,0	236,0	234,0
6	Лигнин гидролизный (полифепан)	5,44	5,35	5,32	5,30	3,58 ±0,37	2,76 ±0,20	2,63 ±0,35	1,87 ±0,08*	243,3	242,0	240,0	230,0
7	МКЦ	5,51	5,36	5,31	5,30	3,17 ±0,41	2,52 ±0,14 [#]	1,43 ±0,18* [#]	1,31 ±0,13* [#]	247,4	245,0	238,0	234,0
8	Контроль	5,52	5,32	5,30	5,21	3,83 ±0,31	3,10 ±0,23	2,18 ±0,28*	1,77 ±0,15*	247,4	243,0	238,0	235,0

Примечание:

- * – p<0,05 по сравнению с исходным значением;
- [#] – p<0,05 по сравнению с контролем.

Анализ результатов периодического контроля физико-химических и биологических показателей сухой биомассы показал, что в течение 18 мес хранения во всех составах количество жизнеспособных лактобактерий составляло не менее 10^9 КОЕ/0,2 г биомассы, показатель кислотообразования был не ниже 200 °Т, значение рН находилось в допустимых пределах (4,5–6,0). В составе биомассы лактобактерий с сорбентом на основе альгината натрия отмечено статистически значимое снижение показателя выживаемости клеток после 6 мес хранения. В составах биомассы, содержащих отруби пшеничные ферментированные, МКЦ и в контроле отмечено статистически значимое снижение показателя выживаемости после 12 мес хранения. Сорбенты на основе гомогената бурых водорослей и лигнина гидролизного обеспечивают стабильность показателя выживаемости лактобактерий в течение 18 мес хранения биомассы.

Таким образом, анализ результатов изменения физико-химических и биологических показателей биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий показал, что сорбенты на основе бурых водорослей, а так же лигнин гидролизный (полифепан) обеспечивают более длительную стабильность показателя выживаемости клеток, что, в свою очередь, позволяет разрабатывать пробиотические препараты с более длительным регламентированным сроком хранения.

4.1.1 Исследование выживаемости иммобилизованных клеток в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека

В исследованиях по изучению выживаемости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий в условиях *in vitro*, имитирующих условия пищеварения в желудке и кишечнике человека в качестве модельных сред использовали кислый раствор пепсина (рН $1,8 \pm 0,2$), щелочной раствор панкреатина (рН $8,2 \pm 0,2$) и желчь медицинскую консервированную (рН 7,2).

Установлено, что количество жизнеспособных бифидобактерий в регидратированных образцах иммобилизованной биомассы и в контрольном образце до контакта с модельными средами составляло не менее 10^8 КОЕ/мл (рис. 3).

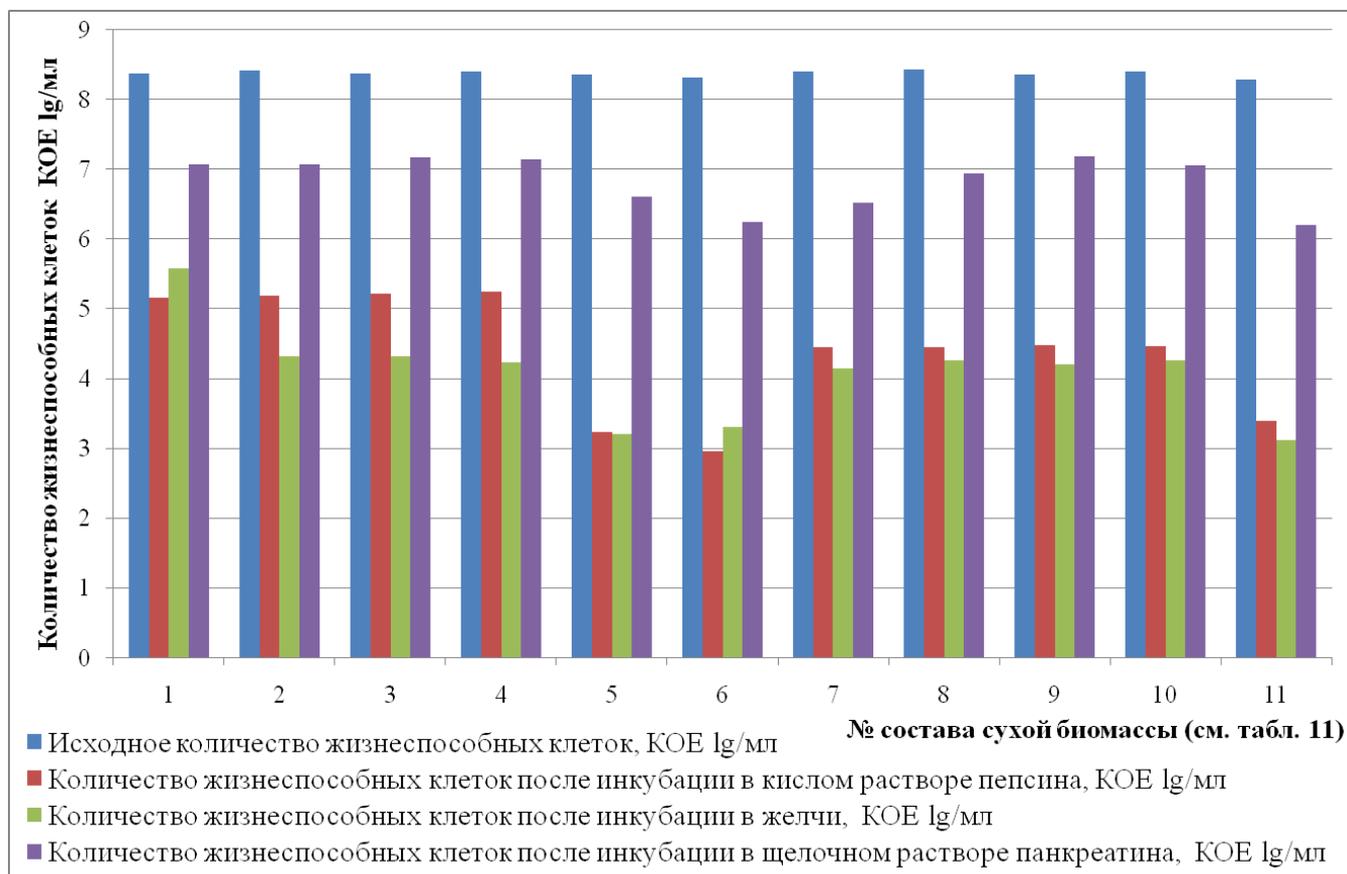


Рисунок 3 – Выживаемость бифидобактерий в модельных средах

После инкубации в кислом растворе пепсина максимальное сохранение жизнеспособных клеток обеспечивали сорбенты на основе ламинарии и фукуса – показатель выживаемости снизился на 3 порядка по сравнению с исходным уровнем. Менее выражены протективные свойства клетчатки, семян льна, лигнина гидролизного и крахмала прежелатинизированного – после действия кислого раствора пепсина количество жизнеспособных бифидобактерий в этих образцах сохраняется на уровне 10^4 КОЕ/мл. Значительное изменение выживаемости наблюдалось в биомассе иммобилизованных бифидобактерий с альгинатом натрия, отрубями ферментированными и в контрольном составе – показатель КОЕ снизился на 5 порядков и более.

Контакт с желчью в течение 2 ч снизил показатель КОЕ на 4–5 порядков в образцах иммобилизованных и свободных клеток. Высокая чувствительность к действию желчи отмечена у образцов контрольного состава, образцов с альгинатом натрия и отрубями ферментированными. Самая высокая устойчивость к действию желчи отмечена у образцов биомассы с ламинарией лиофилизированной. Щелочной раствор панкреатина не оказывает значительного влияния на выживаемость клеток – после экспозиции в течение 2 ч показатель КОЕ снизился на 1–2 порядка по сравнению с исходным значением [61].

На рисунке 4 представлены результаты исследования устойчивости иммобилизованных лактобактерий к действию модельных сред.

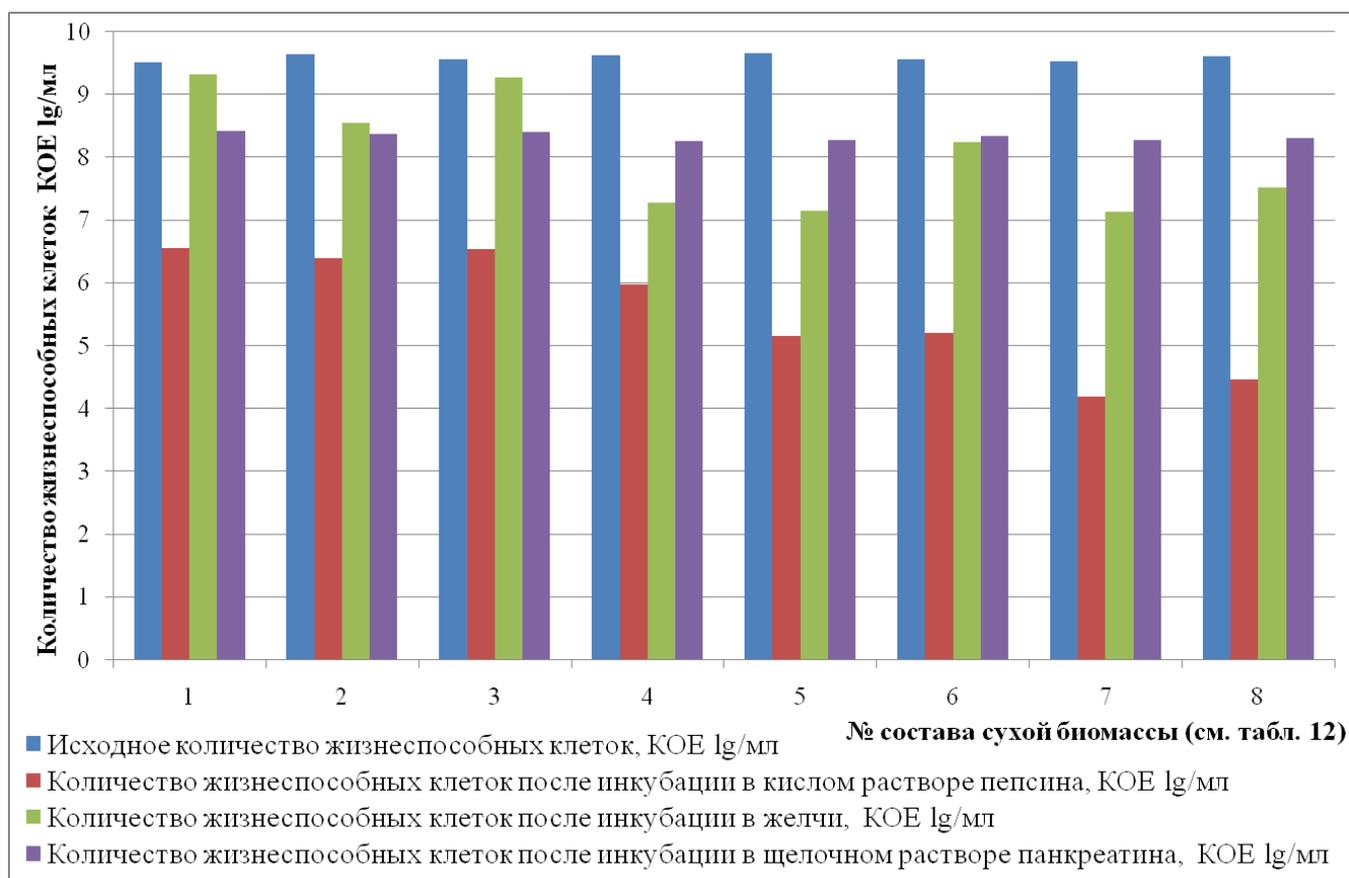


Рисунок 4 – Выживаемость лактобактерий в модельных средах

Количество жизнеспособных лактобактерий в регидратированных образцах биомассы до экспозиции с модельными средами составляло не менее 10^9 КОЕ/мл. После инкубации в кислом растворе пепсина отмечено снижение показателя КОЕ на 3 порядка в образцах биомассы с сорбентами на основе ламинарии и фукуса.

Несколько уступают протективные свойства сорбентов на основе альгината натрия, отрубей пшеничных и лигнина гидролизного – после действия кислого раствора пепсина количество жизнеспособных лактобактерий в этих образцах сохраняется на уровне 10^5 КОЕ/мл (снижение показателя КОЕ на 4 порядка). Выраженная чувствительность к действию кислого раствора пепсина отмечена в образцах биомассы с МКЦ и в контрольном составе без сорбента [112]. После 2-часовой совместной экспозиции с желчью показатель КОЕ сохраняется на уровне 10^9 КОЕ/мл в образцах с сорбентом на основе лиофилизированного порошка ламинарии и фукуса, снижение выживаемости на один порядок отмечено в образцах с ламинарией и лигнином гидролизным. Щелочной раствор панкреатина не оказал значительного влияния на выживаемость лактобактерий – уровень показателя КОЕ снизился на 1 порядок после 2-часовой экспозиции.

Протективные свойства фукуса и ламинарии можно объяснить тем, что указанные сорбенты, взаимодействуют с соляной кислотой желудочного сока и образуют изотропный гель с включенными в него иммобилизованными клетками бифидо- и лактобактерий. Образованная «гелевая капсула» предохраняет клетки от дальнейшего воздействия соляной кислоты и пепсина желудочного сока и тем самым способствует сохранению их жизнеспособности. В тонком кишечнике происходит растворение геля и высвобождение клеток.

Лигнин гидролизный (полифепан), отруби пшеничные ферментированные и клетчатка представляют собой растительные волокна, на поверхности которых сорбируются бактерии, что способствует их устойчивости к действию желудочного сока и желчи.

Семена льна и крахмал прежелатинизированный обладают обволакивающим действием и тем самым защищают клетки от пищеварительных соков.

Таким образом, эксперименты по изучению выживаемости бифидо- и лактобактерий в модельных средах в условиях *in vitro*, имитирующих пищеварение в желудке и кишечнике человека, подтвердили высокую чувствительность пробиотических микроорганизмов штаммов *B. bifidum* 1 и

L. plantarum 8P-A3 к действию биологических жидкостей. Результаты исследований, представленные на рисунках 3, 4 показывают, что бактерицидные свойства желудочного сока и желчи относятся к числу критических факторов, негативно влияющих на жизнеспособность пробиотических микроорганизмов. Однако, иммобилизация клеток позволяет повысить резистентность бифидо- и лактобактерий к действию модельных сред, имитирующих секреты ЖКТ человека. Установлено, что выраженными протективными свойствами обладают сорбенты на основе бурых водорослей (ламинарии и фукуса), при этом защитный эффект объясняется сочетанием наличия полисахаридов в гомогенате водорослей, так и других активных компонентов (хлорофилл, фукоидан, природные антиоксиданты и т.д.). Данные сорбенты, а также сорбенты, оказывающие менее выраженный протективный эффект (альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные, клетчатка, лигнин гидролизный, семена льна и крахмал прежелатинизированный) можно считать пригодными для производства пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток.

4.1.2 Исследование антагонистической активности иммобилизованных бифидо- и лактобактерий

Антагонистическую активность иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, существенно влияющую на эффективность их терапевтического применения, определяли с помощью тестов отсроченного антагонизма и ингибирования биолюминесценции.

У образцов № 5, 7, 8 и 10 (составы с сорбентами на основе альгината натрия, клетчатки, семян льна и крахмала прежелатинизированного) зона подавления роста тест-штамма была меньше нормируемого уровня (15 мм) для бифидосодержащих пробиотиков. Зона задержки роста тест-штамма статистически значимо выше по сравнению с контролем отмечена у образцов

№ 1, 3 и 9 (составы с сорбентами на основе ламинарии и фукуса лиофилизированного, лигнина гидролизного) (табл. 13).

Таблица 13 – Антагонизм иммобилизованных бифидобактерий к *E. coli* 157

№ состава биомассы	Сорбент	Зона задержки роста тест-штамма, мм
1	Ламинария лиофилизированная	19,00*±0,63
2	Ламинарии слоевища измельченные	16,20±0,58
3	Фукус лиофилизированный	18,60*±0,98
4	Фукуса слоевища измельченные	15,20±2,03
5	Альгинат натрия	13,80*±1,56
6	Отруби пшеничные ферментированные	15,20±2,15
7	Клетчатка	14,60±2,29
8	Семена льна	8,00*±0,95
9	Лигнин гидролизный (полифепан)	18,80*±0,37
10	Крахмал прежелатинизированный	13,80±1,85
11	Контроль	17,40±0,24

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Результаты контроля антагонистической активности иммобилизованных лактобактерий (метод «перпендикулярных штрихов») представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Антагонизм иммобилизованных лактобактерий к *E. coli* 157

№ состава биомассы	Сорбент	Зона задержки роста тест-штамма, мм
1	Ламинария лиофилизированная	40,14±0,40
2	Ламинарии слоевища измельченные	39,57±0,69
3	Фукус лиофилизированный	41,17±0,70
4	Альгинат натрия	39,33±0,95
5	Отруби пшеничные ферментированные	39,17±1,08
6	Лигнин гидролизный (полифепан)	40,33±0,99
7	МКЦ	37,83±0,91
8	Контроль	39,67±0,49

У всех образцов зона подавления роста тест-штамма превышала нормируемый минимум (20 мм) для лактосодержащих пробиотиков примерно в 2 раза. Статистически значимых различий между антагонистической активностью иммобилизованных и свободных клеток не выявлено [35].

На рисунке 5 представлены результаты контроля влияния бифидобактерий на биолюминесценцию индикаторного штамма *E. coli lum*⁺.

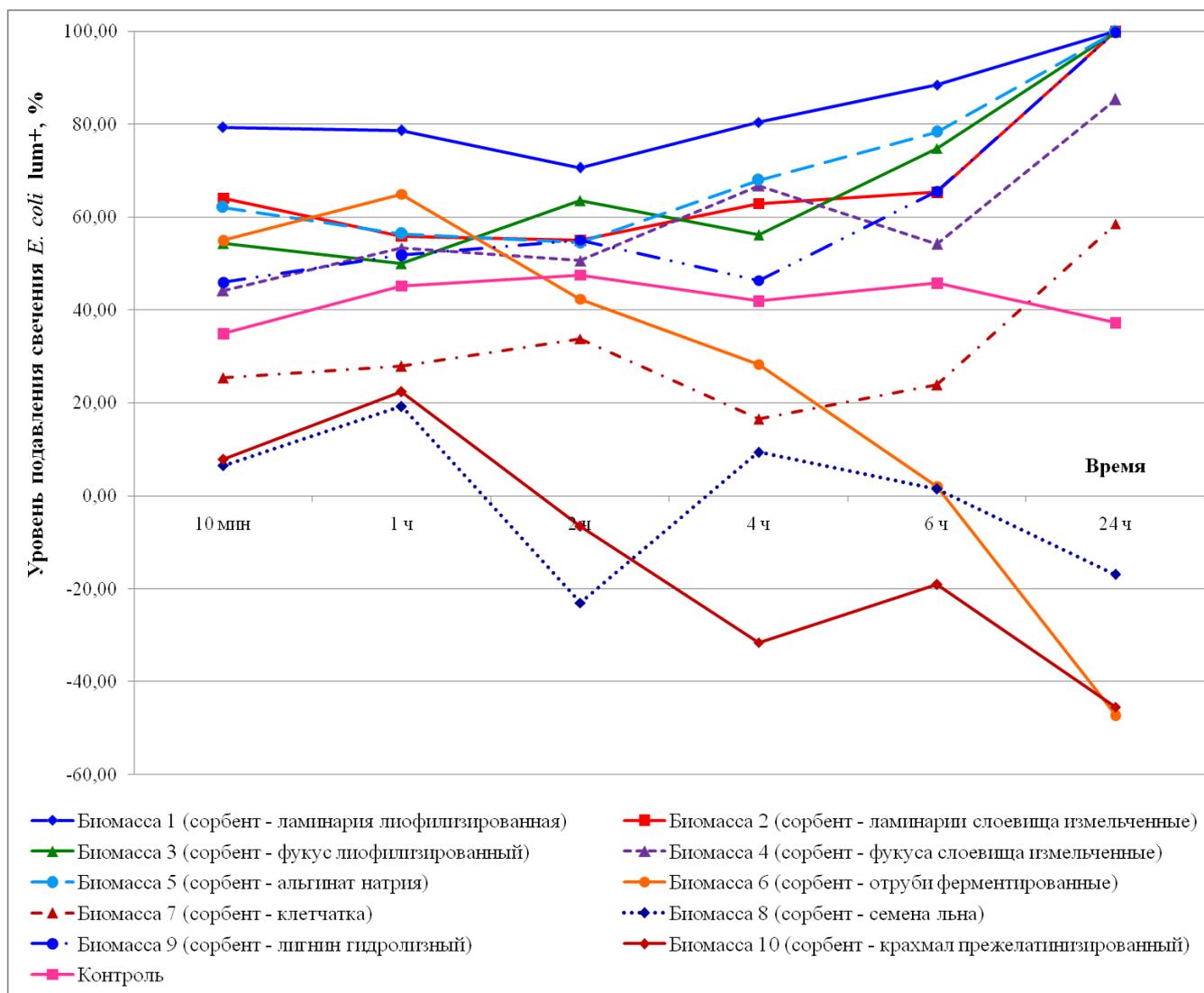


Рисунок 5 – Влияние бифидобактерий на биолюминесценцию *E. coli lum*⁺

В тесте ингибирования биолюминесценции самый высокий индекс антагонистической активности в отношении тест-культуры отмечен у состава № 1 с сорбентом на основе ламинарии лиофилизированной – иммобилизованные бифидобактерии подавляли свечение *E. coli lum*⁺ на уровне выше 70 % в течение всего срока совместной экспозиции, достигая уровня практически 100 % к 24 ч

наблюдения, что соответствует среднему и высокому уровню антагонистической активности. Образцы бифидобактерий № 2, 3, 4 (составы с сорбентами на основе бурых водорослей), № 5 (сорбент – альгинат натрия) и № 9 (сорбент – лигнин гидролизный) на протяжении 6 ч совместной экспозиции с индикаторным штаммом проявляли среднюю антагонистическую активность – уровень подавления биолюминесценции составлял от 40 до 80 % и достигал практически 100 % к 24 ч наблюдения.

У образцов биомассы № 6, 7, 8, 10 (сорбенты – отруби ферментированные, клетчатка, семена льна и крахмал прежелатинизированный) наблюдался низкий и средний уровень антагонистической активности – ИАА составлял от 0 до 65, а образцы № 6, 8, 10 к 24 ч наблюдения стимулировали свечение тест-штамма.

Бифидобактерии без сорбента (контроль) на протяжении 24 ч экспозиции проявляли средний уровень антагонистической активности, подавляя свечение тест-штамма в пределах 35–50 %.

Все исследуемые образцы лактобактерий в тесте подавления биолюминесценции индикаторного штамма *E. coli lum*⁺ проявляли схожую динамику ингибирования свечения, которая характеризовалась последовательным увеличением ИАА, максимум которого (практически 100 % подавления) был отмечен к 24 ч экспозиции. Различия между образцами наблюдались в степени подавления свечения индикаторного штамма в течение первых 4 ч экспозиции. Низкий уровень подавления свечения (меньше 40 %) отмечен у образцов иммобилизованных лактобактерий с сорбентом на основе альгината натрия и МКЦ. Средний уровень угнетения биолюминесценции (от 40 до 80 %) проявляли образцы с сорбентом на основе фукуса, отрубей пшеничных ферментированных и лигнина гидролизного. Образцы лактобактерий, иммобилизованных на ламинарии и образцы контрольного состава подавляли свечение тест-штамма на уровне выше 80 % (рис. 6) [35].

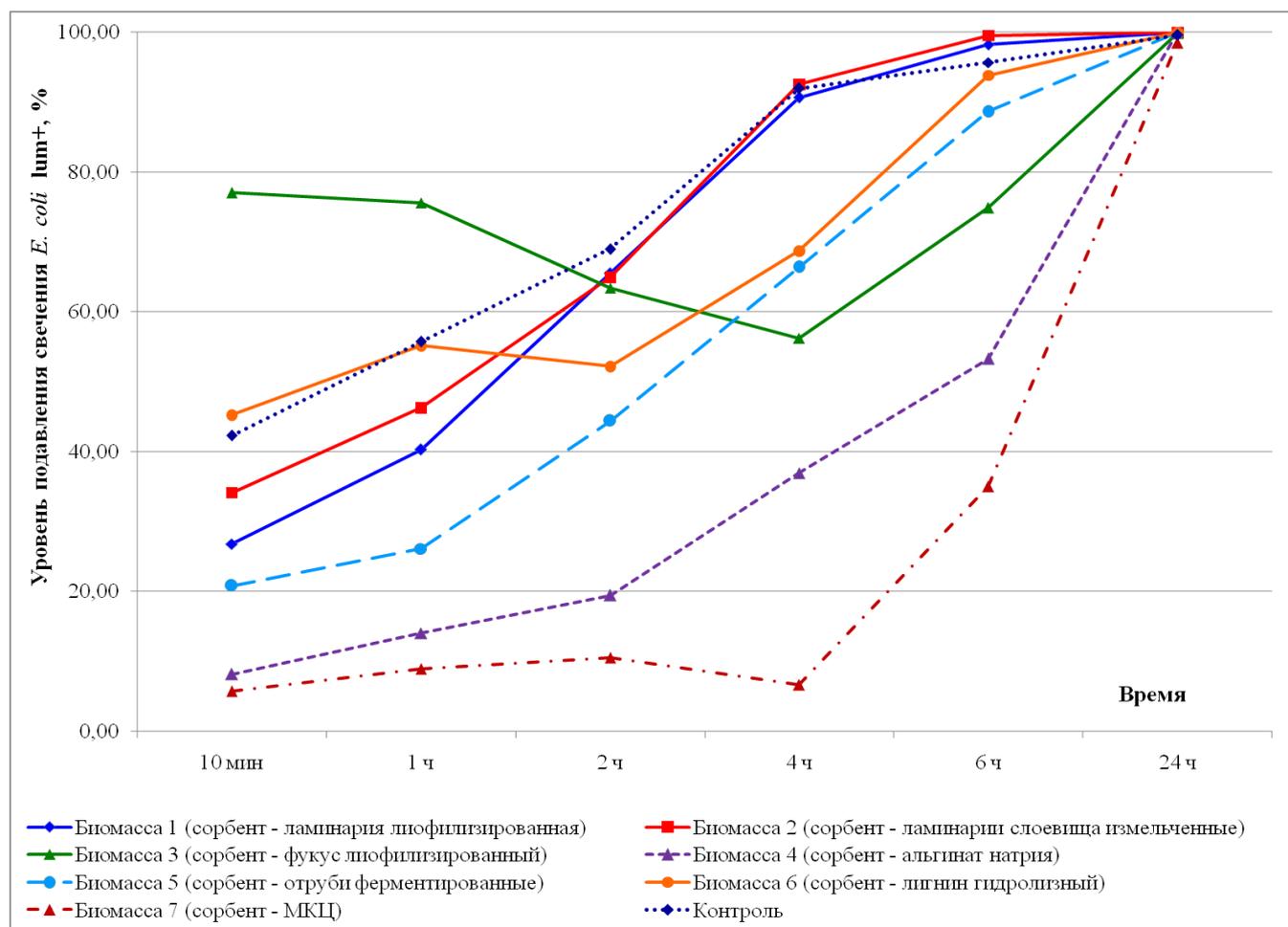


Рисунок 6 – Влияние лактобактерий на биолюминесценцию *E. coli lum⁺*

Анализ полученных результатов свидетельствует, что тест изменения биолюминесценции штамма *E. coli lum⁺* позволяет оценить антагонистическую активность пробиотического препарата в целом, тогда как традиционный метод отсроченного антагонизма дает представление о потенциальной антагонистической активности штаммов, входящих в состав препаратов, которую они проявляют в благоприятных условиях. В тесте подавления биолюминесценции также оценивается метаболическая составляющая препарата, которая играет существенную роль в реализации биологической активности пробиотика.

4.2 Оценка технологических свойств сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий

Следующим критерием выбора перспективных составов сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий являлись показатели остаточной влажности, насыпной плотности, сыпучести и гигроскопичности, необходимые для получения порошков для капсулирования, соответствующих требованиям автоматических капсулонаполнительных машин.

Результаты контроля технологических параметров сухой биомассы бифидобактерий представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Технологические параметры сухой биомассы бифидобактерий

№ состава биомассы	Сорбент	Сыпучесть, г/с	Насыпная плотность, кг/м ³	Насыпная плотность уплотненная, кг/м ³	Остаточная влажность, %	Гигроскопичность, % (φ = 100%)
1	Ламинария лиофилизированная	5,92±0,30	284,37±0,76	404,52±0,81	1,58±0,05	27,58±0,20
2	Ламинарии слоевища измельченные	5,20±0,34	207,22±0,84	309,40±0,49	1,65±0,10	28,78±0,17
3	Фукус лиофилизированный	5,95±0,39	247,33±0,50	377,04±0,72	1,95±0,09	24,28±0,17
4	Фукуса слоевища измельченные	5,96±0,43	305,22±0,58	360,22±0,97	1,60±0,07	32,15±0,26
5	Альгинат натрия	Определение затруднено	227,13±0,68	334,04±0,64	1,58±0,05	33,78±0,15
6	Отруби ферментированные	5,13±0,27	209,92±0,64	307,78±0,53	3,46±0,02	18,48±0,24
7	Клетчатка	5,86±0,31	278,95±0,51	388,44±0,90	1,78±0,06	25,43±0,21
8	Семена льна	Определение затруднено	229,52±0,42	331,58±1,07	1,60±0,04	36,58±0,18
9	Лигнин гидролизный	5,34±0,47	256,77±0,78	332,76±0,83	1,78±0,06	30,20±0,15
10	Крахмал прежелатинизированный	4,56±0,27	229,22±0,92	359,18±0,97	1,55±0,03	22,95±0,19
11	Контроль	5,18±0,33	225,10±0,98	353,12±1,01	1,72±0,07	30,88±0,31

Для получения порошка, обеспечивающего наполнение подходящих капсул достаточным количеством бактериальных клеток (КОЕ не менее 10^8) предпочтительны образцы биомассы с высоким значением насыпной плотности. Наиболее высокой насыпной плотностью обладали составы лиофилизированной биомассы иммобилизованных бифидобактерий № 1, 4, 7, 9 которые также за счет опосредованного влияния насыпной плотности имеют относительно высокие значения сыпучести.

Культура иммобилизованных бифидобактерий в результате лиофильного высушивания образует пористую массу («аэрогель») за счет содержания сорбента и защитной СЖМ среды. При извлечении лиофилизата из кассет и его измельчении (протираем через металлическую сетку с размером ячеек 0,5 мм) происходит разрушение структуры с образованием неоднородной массы (с различным фракционным составом) с преобладанием мелких аморфных частиц. При этом показатели сыпучести не обладают стабильностью при определении методом свободного высыпания из воронки.

Составы, содержащие в качестве сорбента альгинат натрия (состав № 5) и семена льна (состав № 8) имеют более аморфную структуру за счет наличия полисахаридов, не обладают сыпучестью (ее определение было затруднено), имеют более низкие показания насыпной плотности.

Все образцы лиофильно высушенной биомассы обладали высокой гигроскопичностью и в ходе их обработки относительно быстро теряли свои исходные свойства. При определении сыпучести происходило значительное налипание частиц биомассы на воронку прибора и наблюдалось последующее снижение ее текучести вплоть до зависания.

Анализ результатов контроля технологических параметров сухой биомассы лактобактерий показал, что наиболее высокой насыпной плотностью обладали составы биомассы № 2, 6, 7, содержащие в качестве сорбента ламинарии слоевища измельченные, лигнин гидролизный и МКЦ. Образцы биомассы № 1 и 3, обладающие устойчивостью к условиям, имитирующим ЖКТ человека, имеют

достаточную насыпную плотность и перспективны для капсулонаполнения (табл. 16).

Таблица 16 – Технологические параметры сухой биомассы лактобактерий

№ состава биомассы	Сорбент	Сыпучесть, г/с	Насыпная плотность, кг/м ³	Насыпная плотность уплотненная, кг/м ³	Остаточная влажность, %	Гигро-скопичность, % (φ = 100%)
1	Ламинария лиофилизированная	Определение затруднено	254,40±24,2	353,00±17,6	1,7±0,2	13,25±0,16
2	Ламинарии слоевища измельченные	Определение затруднено	280,40±11,3	389,70±22,0	1,6±0,2	13,67±0,23
3	Фукус лиофилизированный	Определение затруднено	238,40±28,2	370,71±34,1	1,5±0,2	14,16±0,14
4	Альгинат натрия	Определение затруднено	258,77±18,8	384,62±17,1	1,6±0,2	13,58±0,19
5	Отруби пшеничные ферментированные	Определение затруднено	268,03±20,6	384,60±15,6	1,8±0,2	14,39±0,21
6	Лигнин гидролизный (полифепан)	Определение затруднено	283,07±11,3	397,90±22,1	1,6±0,2	13,11±0,24
7	МКЦ	Определение затруднено	312,70±10,6	394,90±22,1	1,5±0,2	14,23±0,17
8	Контроль	Определение затруднено	273,65±33,2	389,74±22,1	1,7±0,2	14,08±0,22

Таким образом, с учетом биологических и технологических показателей наиболее перспективными вариантами сухой биомассы иммобилизованных лактобактерий были признаны составы № 1, 2, 3, 6, 7, а иммобилизованных бифидобактерий – № 1, 4, 7, 9 которые могут быть использованы в разработке порошков для наполнения капсул.

Учитывая более выраженную чувствительность бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1 к действию неблагоприятных факторов верхних отделов ЖКТ человека, в дальнейшей работе использовали перспективные составы иммобилизованных бифидобактерий № 1, 4, 7, 9.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КАПСУЛИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Улучшение потребительских характеристик отечественных пробиотиков связывают, в основном, с переходом на выпуск капсулированных форм, что значительно повысит их конкурентоспособность на нашем фармацевтическом рынке.

В данной главе представлена разработка состава и технологии получения порошка для наполнения ТЖК, обоснован выбор типоразмера капсул и вспомогательных веществ, обеспечивающих необходимые технологические свойства биомассы для их наполнения. Приведены результаты исследования физико-химических и технологических свойств экспериментальных образцов препарата в капсулах в процессе хранения, дано описание технологического процесса производства капсулированной лекарственной формы препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий и приведена оценка качества полученной лекарственной формы¹.

5.1 Выбор вспомогательных веществ, обеспечивающих необходимые технологические свойства порошка для наполнения ТЖК

Получение капсулированной лекарственной формы препаратов включает выполнение технологических стадий смешивания компонентов порошка и дозирования. Практический интерес для крупносерийного производства в силу своей экономичности представляет приготовление данной лекарственной формы прямым наполнением без технологической стадии гранулирования порошка. Как

¹ Выражаю благодарность научному сотруднику филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» Мокину П. А. за участие и помощь в проведении данного этапа исследований.

было отмечено ранее, специфика сухой биомассы бифидобактерий (высокая гигроскопичность и, как следствие, нестабильность или отсутствие сыпучести, слеживаемость лиофилизатов в процессе хранения и обработки) ограничивает ее пригодность для непосредственного заполнения ТЖК, поэтому в состав порошка необходимо вводить вспомогательные вещества. Основным путем повышения технологических свойств лиофилизатов заключается в подборе веществ-влажнорегуляторов, обеспечивающих снижение гигроскопичности и улучшение сыпучести данной биологической субстанции. При этом разработка оптимального состава порошка для наполнения желатиновых капсул проводилась как с учетом особенностей капсульной формы, так и технических особенностей капсулирования препарата на автоматических капсулонаполнительных машинах.

В предыдущей главе были представлены результаты исследований по изучению физико-химических и технологических свойств лиофилизатов клеточной биомассы. В качестве перспективных были выбраны варианты биомассы иммобилизованных бифидобактерий с сорбентом на основе ламинарии лиофилизированной, слоевищ фукуса измельченных, клетчатки и лигнина гидролизного (составы № 1, 4, 7, 9).

Выбор вспомогательных веществ определялся с учетом их гигроскопичности (наименьшие значения) и обеспечения сохранения физических свойств порошков, возможности применения в медицинской практике, отсутствия негативного влияния на клетки бифидобактерий и уровень pH.

С учетом этих факторов были использованы лактоза (М 80) и каолин. Получение экспериментальных образцов порошков проводили в асептических условиях. Для обеспечения стандартности гранулометрического состава получаемых образцов биомассу измельчали с помощью сетки с размером ячеек 0,5 мм.

Для обоснования необходимого количества вспомогательных веществ были изготовлены составы порошков на основе биомассы иммобилизованных бифидобактерий (составы № 1, 4) с различным содержанием каолина и лактозы (10, 20, 30 %), изучена их гигроскопичность, стабильность физических показателей при повышенной влажности воздуха и насыпная плотность.

Как видно из таблицы 17, показатели гигроскопичности полученных порошков имели близкие значения и не позволяли сделать однозначное прогностическое заключение об их стабильности. Поэтому в процессе экспозиции составов при относительной влажности воздуха 100 % проводили контроль их гигроскопичности с одновременной оценкой физического состояния (изменение цвета порошка, сохранение сыпучести). Порошки с лактозой через 1–2 ч теряли сыпучесть, происходила контракция объема порошка и изменение его цвета. Составы, в которых в качестве вспомогательного вещества применяли каолин, сохраняли свои свойства даже через 24 ч экспозиции. Для получения стабильных составов с лактозой в качестве вспомогательного вещества ее необходимо вводить в значительном количестве в соотношении 1:1–1:2 по отношению к биомассе бифидобактерий, что применительно к капсульной форме препарата приводит к увеличению объема и массы дозы.

Таблица 17 – Технологические параметры порошков с различным составом вспомогательных веществ

Состав порошка	Гигроскопичность, % (φ = 100%)	Насыпная плотность, кг/м ³
Биомасса № 1 + лактоза 10 %	7,22±0,23	518,86±7,01
Биомасса № 1 + лактоза 20 %	5,68±0,20	591,92±5,94
Биомасса № 1 + лактоза 30 %	5,95±0,14	603,48±6,92
Биомасса № 1 + каолин 10 %	5,78±0,27	479,74±6,84
Биомасса № 1 + каолин 20 %	5,55±0,17	551,68±9,64
Биомасса № 1 + каолин 30 %	5,51±0,17	490,82±4,83
Биомасса № 4 + лактоза 10 %	6,82±0,25	524,90±6,20
Биомасса № 4 + лактоза 20 %	5,62±0,26	590,62±5,07
Биомасса № 4 + лактоза 30 %	4,98±0,23	607,08±7,71
Биомасса № 4 + каолин 10 %	5,48±0,15	496,86±8,27
Биомасса № 4 + каолин 20 %	5,25±0,20	545,16±10,10
Биомасса № 4 + каолин 30 %	5,20±0,26	525,44±6,35

Более перспективным был признан вариант порошка с каолином в количестве 20 % от массы лиофилизата. Увеличение его содержания не приводит к значимому снижению гигроскопичности и уменьшает насыпную плотность порошка.

Для комплексной оценки влияния сорбента и вспомогательного вещества на технологические свойства порошков были наработаны варианты составов на основе наиболее перспективных образцов биомассы бифидобактерий (составы № 1, 4, 7, 9) с каолином (в количестве 20 % от массы лиофилизата) и лактозой (в количестве 30 % от массы лиофилизата), изучены их технологические параметры (табл. 18).

Таблица 18 – Технологические параметры порошков для наполнения капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий

№ состава порошка	Сорбент	Вспомогательное вещество (% относительно общей массы порошка)	Сыпучесть, г/с	Насыпная плотность, кг/м ³	Насыпная плотность уплотненная, кг/м ³
1	Ламинария лиофилизированная	Лактоза (30 %)	3,88±0,33	582,5±6,8	909,1±4,9
2		Каолин (20 %)	3,32±0,30	550,3±9,4	882,1±2,6
3	Фукуса слоевища измельченные	Лактоза (30 %)	8,65±0,88	626,9±6,2	793,6±5,7
4		Каолин (20 %)	2,30±0,11	543,3±9,3	833,3±7,7
5	Клетчатка	Каолин (20 %)	3,80±0,14	488,8±5,5	765,7±5,7
6		Лактоза (30 %)	8,00±0,48	541,4±4,1	769,2±6,8
7	Лигнин гидролизный (полифепан)	Каолин (20 %)	3,24±0,34	498,3±5,2	760,6±7,4
8		Лактоза (30 %)	8,04±0,54	538,4±6,0	714,3±3,6

Допустимая сыпучесть отмечалась у состава № 4 и соответствовала значениям (2,5±0,5) г/с, удовлетворительную сыпучесть, соответствующую значениям (3,0–6,5) г/с, показали составы № 1, 2, 5, 7. Образцы порошков № 3, 6, 8 с лактозой обладали значительно более высоким показателем сыпучести в сравнении с порошками, в состав которых входит каолин. Однако, как было отмечено выше, введение лактозы не обеспечивает сохранение свойств порошка в процессе хранения. Было отмечено еще одно свойство каолина – введение его в состав порошка в количестве не менее 20 % от количества сухой биомассы

бифидобактерий обеспечивает антифрикционный эффект, который выражается в снижении адгезии порошка к рабочим частям капсулонаполнительных машин. Это особенно важно при высокой скорости капсулирования. В составы с лактозой для обеспечения бесперебойной работы капсульных машин требуется дополнительное введение магния стеарата или талька.

Лучшие показатели насыпной плотности показали составы № 1, 2, 3, 4, они соответствовали значениям – 626,3 кг/м³ (состав № 3), 582,4 кг/м³ (состав № 1), 550,3 кг/м³ (состав № 2), 543,4 кг/м³ (состав № 4).

Таким образом, при изучении технологических характеристик (сыпучесть, насыпная плотность, гигроскопичность) вариантов капсулируемых порошков на основе лиофилизатов иммобилизованных бифидобактерий установлено, что наиболее целесообразным является моделирование состава композиций с использованием наполнителей. Экспериментально установлено, что оптимальным наполнителем является каолин в количестве 20 % от массы лиофилизата, что обеспечивает получение порошка с технологическими свойствами, удовлетворяющими требования производства. Образцы, содержащие каолин, имеют высокую степень уплотнения, что позволяет при объемном способе дозирования и подпрессовки порошка сформировать минимальную дозу, содержащую необходимое количество жизнеспособных клеток, для оптимального наполнения капсулы при работе капсульных машин.

5.2 Обоснование выбора типоразмера капсул, получение экспериментальных образцов и оценка их стабильности в процессе хранения

Выбор оптимального типоразмера капсулы проводили с учетом нескольких факторов. Во-первых, порошок должен максимально заполнять объем капсулы, что обеспечивает минимальное количество в ней воздуха и, тем самым, способствует стабильности содержимого и увеличению биологической доступности (исключается флотация капсулы в желудке). Во-вторых, доза

порошка в капсуле должна содержать не менее 10^8 КОЕ бифидобактерий, что соответствует 0,2 г лиофилизата или 0,25 г порошка.

Как видно из таблицы 19, некоторые составы порошков имели несколько больший объем дозы для наполнения капсулы, чем средняя емкость капсулы. Для этих составов, с учетом возможности подпрессовки порошка при дозировании на автоматической капсулонаполнительной машине, можно добиться оптимальных показателей (объем дозы не более средней емкости капсулы) с сохранением точности дозировки.

Таблица 19 – Ориентировочные значения заполнения капсул порошком

№ состава порошка для капсулирования	№ капсул	Средняя вместимость капсулы, см ³	Среднее значение объема в капсуле, заполняемого дозой порошка (0,25 г), %	Среднее значение свободного объема капсулы, %
1	1	0,50	67,11	32,89
2			69,83	30,17
3			70,52	29,48
4			72,67	27,33
5			79,87	20,13
6			76,34	23,66
7			79,49	20,51
8			79,87	20,13
1	2	0,37	90,69	9,31
2			94,37	5,63
3			95,30	4,70
4			98,21	1,79
5			107,94*	–
6			103,16*	–
7			107,42*	–
8			107,94*	–
1	3	0,3	111,86	–
2			116,39	–
3			117,54	–
4			121,12	–
5			133,12	–
6			127,23	–
7			133,12	–
8			133,03	–

Примечание: *– возможно применение данного типа капсул с использованием подпрессовки на автоматических машинах.

Капсулы № 3 со средней вместимостью 0,3 см³ не позволяют вместить дозу порошка с необходимым содержанием бифидобактерий. Применение значительной подпрессовки при наполнении капсул негативно влияет на выживаемость бифидобактерий и способствует износу частей капсульной машины. При использовании капсул № 1 остается значительный свободный объем капсулы.

Таким образом, наиболее подходящими для наполнения являются ТЖК № 2 со средней вместимостью 0,37 см³, что аналогично пробиотическим препаратам, представленным на фармацевтическом рынке («Линекс» – размер капсул № 2, «Йогулакт» – № 2, «Аципол» – № 2, «Вагилак» – № 2). Полезный объем выбранного номера капсулы обеспечивает возможность ее наполнения порошком с необходимой дозировкой бифидобактерий на начало срока годности препарата (количество КОЕ/доза не менее 10⁸).

Образцы порошков помещали в ТЖК № 2 (Capsugel, Бельгия) при помощи капсульной машины МС-1,2 (Италия). У полученных экспериментальных образцов были определены: средняя масса капсулы, средняя масса содержимого капсулы и отклонения от показателей средней массы (табл. 20).

Таблица 20 – Однородность массы перспективных вариантов капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий

№ состава порошка	Средняя масса капсулы, мг	Отклонения от средней массы капсулы, % (не более 7,5 %)	Средняя масса содержимого капсулы, мг	Отклонения от средней массы содержимого капсулы, % (не более 10 %)
1	310,6	-5,0 +3,3	254,4	-3,7 +4,9
2	310,8	-3,4 +4,5	254,1	-4,2 +4,3
3	310,5	-4,0 +4,6	254,0	-4,3 +5,5
4	313,3	-4,5 +4,3	257,0	-3,5 +3,8
5	308,8	-2,8 +2,6	252,1	-3,2 +3,5
6	310,0	-3,2 +2,8	254,3	-2,5 +1,8
7	310,1	-3,2 +3,1	254,3	-2,4 +3,0
8	307,3	-2,3 +3,8	251,8	-3,0 +2,4

Все образцы капсул соответствовали требованиям ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм», что позволяет сделать заключение о приемлемости технологических свойств полученных порошков для наполнения капсул.

Введение вспомогательных веществ позволяет снизить гигроскопичность, улучшить технологические параметры порошка, необходимые для его оптимального и точного дозирования в желатиновые капсулы и обеспечивающие его стабильность в процессе хранения. Однако, введение вспомогательных веществ не гарантирует сохранения технологических свойств (особенно остаточной влажности) в течение всего предполагаемого срока годности. Поэтому очень важным является выбор вида упаковки, обеспечивающей защиту препарата от влажности и кислорода воздуха, и ее соответствие современным требованиям, учитывающим потребительские предпочтения и технико-экономические аспекты производства пробиотиков.

Полученные экспериментальные образцы капсул упаковывали в герметично закрывающиеся полимерные банки с винтовой горловиной из полиэтилена высокой плотности, снабженные крышками с силикагелевой вставкой (масса силикагеля 2 г) и контролем первого вскрытия (Nolato Cerbo, Швеция).

С целью изучения стабильности капсульной формы пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий экспериментальные образцы капсул были заложены на хранение при температуре (5 ± 3) °С и ежеквартально контролировались по основным показателям: внешний вид, распадаемость, потеря в массе при высушивании, рН, специфическая активность.

Результаты контроля физико-химических и биологических параметров капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Параметры капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий

№ серии капсул	Сорбент / вспомогательное вещество, % относительно общей массы порошка	Срок хранения (мес)	Распадаемость (не более 20 мин)	pH (от 5,5 до 6,5)	Потеря в массе при высушивании, % (Не более 3,5 %)	Специфическая активность	
						Количество живых бифидо- бактерий <i>B. bifidum</i> 1 (в 1 г не менее 10 ⁸ КОЕ)	Активность кислого- образования (не ниже 90 °Т)
1	Ламинария лиофилизированная / лактоза, 30 %	0	соотв.	6,14	1,7	(10,25±1,89)×10 ⁸	129,3
		6	соотв.	6,24	2,0	(8,40±0,68)×10 ⁸	130,0
		12	соотв.	6,19	2,8	(4,33±0,52)*×10 ⁸	128,0
		18	соотв.	6,17	3,2	(4,15±0,43)*×10 ⁸	128,0
2	Ламинария лиофилизированная / каолин, 20 %	0	соотв.	6,11	1,6	(9,00±0,41)×10 ⁸	133,3
		6	соотв.	6,25	2,1	(8,03±0,68)×10 ⁸	133,0
		12	соотв.	6,23	2,4	(7,75±0,50)×10 ⁸	130,0
		18	соотв.	6,21	2,7	(6,02±0,28)*×10 ⁸	128,0
3	Фукуса слоевища измельченные / лактоза, 30 %	0	соотв.	6,18	1,5	(7,00±0,91)×10 ⁸	133,3
		6	соотв.	6,20	2,3	(6,40±0,87)×10 ⁸	131,0
		12	соотв.	6,24	3,0	(4,65±0,25)*×10 ⁸	130,0
		18	соотв.	6,18	3,3	(4,33±0,29)*×10 ⁸	130,0
4	Фукуса слоевища измельченные / каолин, 20 %	0	соотв.	6,18	1,6	(11,50±2,90)×10 ⁸	132,3
		6	соотв.	6,21	1,9	(8,00±0,91)×10 ⁸	134,0
		12	соотв.	6,21	2,4	(6,33±0,25)×10 ⁸	132,0
		18	соотв.	6,16	2,5	(5,08±0,25)*×10 ⁸	130,0
5	Клетчатка / каолин, 20 %	0	соотв.	6,25	1,8	(4,95±0,41)×10 ⁸	129,3
		6	соотв.	6,21	2,0	(4,75±0,48)×10 ⁸	132,0
		12	соотв.	6,27	2,4	(3,83±0,31)×10 ⁸	132,0
		18	соотв.	6,21	2,7	(2,50±0,24)*×10 ⁸	130,0
6	Клетчатка / лактоза, 30 %	0	соотв.	6,27	1,6	(9,00±0,41)×10 ⁸	139,4
		6	соотв.	6,13	2,4	(6,75±1,38)×10 ⁸	133,0
		12	соотв.	6,28	2,6	(2,05±0,39)*×10 ⁸	130,0
		18	соотв.	6,24	3,0	(1,98±0,41)*×10 ⁸	125,0
7	Лигнин гидролизный (полифепан) / каолин, 20 %	0	соотв.	6,09	1,5	(6,40±0,51)×10 ⁸	133,3
		6	соотв.	6,21	2,5	(5,75±1,11)×10 ⁸	130,0
		12	соотв.	6,09	2,7	(4,00±0,82)*×10 ⁸	126,0
		18	соотв.	6,00	2,9	(2,93±0,51)*×10 ⁸	125,0
8	Лигнин гидролизный (полифепан) / лактоза, 30 %	0	соотв.	6,06	1,6	(6,13±0,43)×10 ⁸	132,3
		6	соотв.	6,10	2,0	(5,50±0,56)×10 ⁸	128,0
		12	соотв.	6,05	2,3	(2,70±0,72)*×10 ⁸	128,0
		18	соотв.	5,99	3,2	(2,15±0,54)*×10 ⁸	126,0

Примечание: 1. * – p<0,05 по сравнению с исходным значением;
2. соотв. – соответствует.

В процессе и к концу срока наблюдения (18 мес) внешний вид препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий в капсулах практически не изменялся и представлял собой порошок серовато-белого цвета с различными оттенками в зависимости от применяемого сорбента. Во всех образцах уровень активности кислотообразования составлял не ниже 90 °Т, значение рН сохранялось в допустимых пределах (5,5–6,5), распадаемость капсул в воде не превышала 20 мин, потеря в массе при высушивании составляла не более 3,5 %. Значение показателя выживаемости клеток сохранялось на уровне 10^8 КОЕ/г, однако стоит отметить, что в образцах с лактозой (серии капсул № 1, 3, 6, 8) данный показатель статистически значимо снижался после 12 мес хранения по сравнению с исходным значением, тогда как в образцах с каолином показатель КОЕ/г статистически значимо снижается после 18 мес хранения, за исключением образца № 7 с сорбентом на основе лигнина гидролизного. В образцах капсул № 2 и 4 (серии капсул с ламинарией лиофилизированной, фукусом и каолином) количество жизнеспособных бифидобактерий составляло не менее 5×10^8 КОЕ/г к концу срока наблюдения.

Таким образом, результаты периодического контроля экспериментальных образцов капсул подтверждают, что сорбент на основе бурых водорослей и каолин в качестве вспомогательного вещества обеспечивают стабильность физико-химических и биологических показателей капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий в течение 18 мес хранения, что является преимуществом по сравнению с другими экспериментальными образцами и определяет выбор производственного варианта состава капсул.

5.3 Получение экспериментально-производственных серий препарата «Имбикапс» и контроль в процессе хранения

На основании проведенных экспериментальных работ были получены 5 экспериментально-производственных серий пробиотического препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий в ТЖК, получившего название «Имбикапс». В качестве сорбента использовали гомогенат ламинарии, как наиболее экономически выгодного варианта, который оказывает протективный эффект в отношении бифидобактерий при прохождении через верхние отделы ЖКТ человека. В качестве вспомогательного вещества использовали каолин в количестве 20 % массы лиофилизата. Экспериментально-производственные серии капсулированного препарата получали на автоматической капсулонаполняющей машине Zanasi 40F (ИМА, Италия). Капсулы упаковывали в полимерные банки с винтовой горловиной из полиэтилена высокой плотности, с крышками с силикагелевой вставкой и контролем первого вскрытия.

Полученные серии препарата «Имбикапс» были заложены на хранение при температуре (5 ± 3) °С и контролировались по показателям, представленным в разработанной спецификации (табл. 22). По микробиологическим показателям препарат «Имбикапс» должен соответствовать требованиями «Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденные решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 г. № 299», (группа 21, п.10.10), СанПиН 2.3.2.1078-01 (п.10.10.1). Суточная доза препарата «Имбикапс» (4 капсулы) содержит 1 г активного компонента, что соответствует КОЕ не менее 5×10^8 бифидобактерий (адекватный уровень суточного потребления согласно МР 2.3.1.1915-04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ»).

Таблица 22 – Спецификация препарата «Имбикапс», капсулы.

Наименование показателя	Метод	Норма
1	2	3
Описание	Органолептический	Твердые желатиновые капсулы цилиндрической формы с полусферическими концами с сухим порошком бежевого или беловато-серого цвета с редкими темными вкраплениями со специфическим запахом.
Подлинность	Микроскопический, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0012.15 Бактериологический	В мазках, окрашенных по Граму, должны быть неподвижные грамположительные полиморфные палочки длиной 4–5 мкм с бифуркацией на одном или двух концах, располагающиеся в виде скоплений или отдельных клеток. Устанавливается по присутствию в препарате живых бифидобактерий одновременно с их количественным определением.
Вкус содержимого капсулы	Органолептический	Сладковатый
Активность кислотообразования, °Т	Метод кислотно-основного титрования, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0009.15	Не менее 90
pH	Потенциометрический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15	От 5,5 до 6,5
Потеря в массе при высушивании, %, не более	Гравиметрический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0010.15	3,5
Средняя масса капсулы, г	Весовой, ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0009.15	От 0,29 до 0,33
Распадаемость, мин	Визуальный, ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0013.15	Не более 20 мин в воде
Бифидобактерий штамма <i>B. bifidum</i> 1, КОЕ/г	Бактериологический, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0009.15	Не менее 5×10^8
БГКП (колиформы) в 1,0 г	Микробиологический, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0002.15	Не допускается
<i>E. coli</i> в 5,0 г		Не допускается
<i>Staphylococcus aureus</i> в 1,0 г		Не допускается
Патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 10 г		Не допускается
Дрожжи, в 1,0 г, не более		50
Плесени, в 1,0 г, не более		50
Упаковка		По 40 или 60 капсул в полимерной банке с крышкой с силикагелевой вставкой и кольцом контроля первого вскрытия. По 1 банке в картонной пачке.

Продолжение таблицы 22

1	2	3
Маркировка		В соответствии с ТУ 9197-161-14237183-2011 изм. № 1.
Транспортирование		При температуре от 2 до 8 °С
Хранение		При температуре от 2 до 8 °С
Срок годности		18 мес

Срок наблюдения для оценки стабильности физико-химических и биологических параметров препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий был определен в 21 мес. Условия хранения препарата, учитывая его биологическую природу и влияние на нее термофакторов, были стандартными и воспроизводили условия бытового холодильника, что позволило комплексно изучить воздействие внешней среды и защитную функцию материала упаковки по отношению к капсулам.

Результаты периодического контроля показали, что при хранении в течение 21 мес качество ТЖК соответствовало предъявляемым к данной форме требованиям согласно спецификации на препарат «Имбикапс». В процессе и к концу срока наблюдения внешний вид препарата в капсулах визуально не изменялся и представлял собой сухой порошок бежевого или беловато-серого цвета с редкими темными вкраплениями со специфическим запахом. В воде очищенной распадаемость капсул составляла не более 20 мин с образованием мутной суспензии желтовато-бежевого цвета с частицами остатков оболочки капсулы. Отклонение в средней массе капсулы не превышало $\pm 7,5$ %. Показатель остаточной влажности не превышал 3,5 % во всех исследуемых образцах. Значения рН содержимого капсулы находились в пределах 5,5–6,5. При контроле параметров специфической активности и микробиологической чистоты было установлено, что их необходимый уровень сохранялся в течение срока наблюдения (количество жизнеспособных бифидобактерий не менее 5×10^8 КОЕ/г, активность кислотообразования не менее 90 °Т; условно-патогенные и патогенные микроорганизмы в препарате не обнаружены) (табл. 23) [113].

Таблица 23 – Параметры экспериментально-производственных серий препарата «Имбикапс» при хранении

№ серии	Срок хранения (мес)	Внешний вид	Средняя масса капсулы	рН	Потеря в массе при высушивании	Активность кислото-образования	Бифидо-бактерий штамма <i>B. bifidum</i> 1	Микробиологическая чистота					
								БГКП (количество), в 1,0 г (не допускаются)	<i>E. coli</i> , в 5,0 г (не допускаются)	<i>S. aureus</i> , в 1,0 г (не допускаются)	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 50 г (не допускаются)	Дрожжи, КОЕ/г, не более 50	Плесени, КОЕ/г, не более 50
1	6	соответствует	0,311	5,96	1,90	127	$8,7 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	12	соответствует	0,314	5,96	2,30	132	$7,3 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	18	соответствует	0,316	5,93	2,60	122	$6,4 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	21	соответствует	0,318	5,90	2,70	125	$6,0 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	10
2	6	соответствует	0,308	6,06	2,00	126	$7,3 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	12	соответствует	0,310	5,95	2,10	121	$6,8 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	18	соответствует	0,312	5,96	2,70	132	$6,4 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	21	соответствует	0,310	5,89	2,75	127	$6,1 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
3	6	соответствует	0,298	6,08	2,10	125	$7,7 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	10
	12	соответствует	0,305	5,96	2,40	126	$7,1 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	18	соответствует	0,302	5,99	2,70	138	$6,8 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	21	соответствует	0,304	5,91	2,80	131	$6,2 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
4	6	соответствует	0,306	6,08	2,10	121	$7,6 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	12	соответствует	0,305	6,04	2,30	126	$7,1 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	18	соответствует	0,308	5,96	2,80	135	$6,8 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	21	соответствует	0,308	5,95	2,85	129	$6,0 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
5	6	соответствует	0,312	5,89	1,90	148	$6,6 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	12	соответствует	0,312	5,86	2,10	124	$5,8 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.
	18	соответствует	0,314	5,97	2,60	117	$5,1 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	10
	21	соответствует	0,315	5,93	2,70	120	$5,2 \times 10^8$	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	не обнар.	не обнар.

Примечание: 1. соотв. – соответствует; 2. не обнар. – не обнаружено.

Таким образом, проведенные исследования позволили подтвердить минимальный срок годности (хранения) для капсульной формы препарата – 18 мес, а также показали целесообразность использования в технологии для первичной упаковки капсул полимерных банок с винтовой крышкой, имеющей силикагелевую вставку.

5.4 Определение специфической активности иммобилизованных бифидобактерий и препарата «Имбикапс»

Было проведено сравнительное изучение адгезивных свойств иммобилизованных (на гомогенате бурых водорослей) и свободных бифидобактерий (табл. 24).

Таблица 24 – Адгезивные свойства бифидобактерий

№ состава биомассы	Сорбент	Средний показатель адгезивности	Степень адгезии	Индекс адгезивности микроорганизма	Микроорганизмы
Л1	Ламинария	$0,35 \pm 0,15$	нулевая	1,00	неадгезивные
Л2		$0,51 \pm 0,24$	нулевая	1,04	неадгезивные
Ф1	Фукус	$0,43 \pm 0,20$	нулевая	1,02	неадгезивные
Ф2		$0,36 \pm 0,21$	нулевая	1,06	неадгезивные
Контроль	–	$0,32 \pm 0,19$	нулевая	1,00	неадгезивные

Средний показатель адгезии (СПА) у всех исследуемых образцов не превышает 1, что соответствует нулевой адгезивной активности. Индекс адгезивности микроорганизмов находится в пределах от 1,00 до 1,75, таким образом, микроорганизмы неадгезивные. Статистически значимых различий между свободными и иммобилизованными клетками не выявлено.

Низкая адгезивная активность означает, что бифидобактерии, попадая в толстый кишечник, не вытеснят собственные микроорганизмы хозяина и окажут терапевтический эффект за счет физиологической активности (выработка

метаболитов, стимулирующих облигатную микрофлору) во время транзита по кишечнику.

Определена чувствительность бифидобактерий, иммобилизованных на гомогенате бурых водорослей, к антибиотикам диск-диффузионным методом на плотной питательной среде Блаурокка с использованием стандартного набора дисков с антибиотиками. В качестве контроля использовали сухую биомассу бифидобактерий без сорбента (табл. 25).

Таблица 25 – Антибиотикочувствительность бифидобактерий

Биомасса Антибиотик	Диаметр зоны подавления роста, мм				
	Л1	Л2	Ф1	Ф2	Контроль
Ампициллин	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Цефазолин	45,75 ± 3,37	41,67 ± 5,77	45,00 ± 7,07	39,00 ± 0,58	> 50
Цефалотин	41,67 ± 5,77	36,75 ± 5,68	35,00 ± 7,07	32,50 ± 5,26	> 50
Цефуросим	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Цефотаксим	> 50	> 50	39,33 ± 0,50	> 50	> 50
Цефтриаксон	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Цефтазидим	36,25 ± 4,11	33,33 ± 5,77	36,66 ± 5,77	39,33 ± 1,15	> 50
Цефалексин	37,07 ± 2,53	39,00 ± 6,93	39,33 ± 2,08	42,67 ± 2,51	> 50
Цефепим	> 50	39,00 ± 1,73	> 50	39,67 ± 1,50	> 50
Тетрациклин	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Левомецетин	> 50	> 50	42,00 ± 2,65	> 50	42,00 ± 2,65
Канамицин	38,21 ± 3,12	36,38 ± 3,54	35,23 ± 5,77	37,23 ± 3,17	41,70 ± 3,12
Гентамицин	25,50 ± 3,31	25,50 ± 7,37	18,00 ± 4,69	20,75 ± 5,38	19,50 ± 1,00
Тобрамицин	23,00 ± 2,45	25,50 ± 3,32	17,75 ± 1,70	24,25 ± 2,99	17,50 ± 3,00
Офлоксацин	26,50 ± 4,36	28,00 ± 2,89	29,00 ± 1,56	32,50 ± 5,80	17,75 ± 3,20
Карбенициллин	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Полимиксин	18,00 ± 2,45	19,75 ± 0,50	18,75 ± 1,50	19,75 ± 3,86	15,50 ± 1,30
Фурадонин	28,33 ± 1,53	29,00 ± 1,82	21,33 ± 2,30	39,25 ± 0,96	30,50 ± 1,00
Амикацин	12,25 ± 2,06	8,00 ± 3,46	12,50 ± 5,74	14,00 ± 1,15	11,00 ± 1,15
Ципрофлоксацин	21,25 ± 2,50	24,00 ± 5,30	19,75 ± 3,30	26,00 ± 5,29	21,00 ± 1,15

В результате сравнительного контроля антибиотикочувствительности иммобилизованных и свободных клеток бифидобактерий установлено, что иммобилизованные клетки по уровню устойчивости к действию антибиотиков не уступают контролю, а в ряде случаев имеют преимущества. Все изученные образцы показали высокую чувствительность (диаметр зоны подавления роста более 50 мм) к ампициллину, цефуроксиму, цефтриаксону, тетрациклину, карбенициллину. Образцы иммобилизованных бифидобактерий менее чувствительны по сравнению с контролем к цефазолину, цефалотину, цефтазидиму, цефалексину.

Проведен сравнительный анализ антагонистической активности пробиотических препаратов на основе иммобилизованных бифидобактерий. В работе использовали препараты на основе иммобилизованных бифидобактерий «Бифидумбактерин форте» (производства ЗАО «Партнер», Россия) и «Имбикапс». В качестве препарата сравнения использовали «Бифидумбактерин» (лиофилизат во флаконе) с неиммобилизованными клетками (производства ФГУП АО «Микроген», Россия).

В тесте отсроченного антагонизма на плотной питательной среде Блаурокка зона задержки роста индикаторной культуры составляла не менее 18 мм у «Имбикапса» и «Бифидумбактерина», у «Бифидумбактерина форте» – 17,11 мм. На среде МРС-5 также не отмечено достоверно значимых различий у препаратов в проявлении антагонистической активности по отношению к тест-штамму.

Выявлено достоверно значимое различие между совокупностью показателей антагонистической активности бифидосодержащих пробиотиков на плотных средах Блаурокка и МРС-5, на последней зоны подавления роста тест-штамма менее выражены. Это связано с тем, что среда Блаурокка является более адекватной (элективной) питательным потребностям бифидобактерий, чем среда МРС-5, которая предназначена, в основном, для культивирования лактобактерий. Питательный потенциал обеих сред обеспечивает хороший рост подсеваемого к исследуемой культуре тест-штамма, но сама контролируемая культура бифидобактерий лучше растет на среде Блаурокка, что позволяет получить более

стабильную и полноценную характеристику ее антагонистических свойств. Размеры зон задержки роста тест-штаммов на среде Блаурокка более выражены и относительно менее вариабельны, что не всегда наблюдается при использовании среды МРС-5 (табл. 26).

Таблица 26 – Антагонизм препаратов-пробиотиков к *E. coli* M-17

Препараты	Зона задержки роста тест-штамма, мм	
	На среде Блаурокка	На среде МРС-5
«Имбикапс»	18,36 ± 0,82	16,57 ± 0,48*
«Бифидумбактерин Форте»	17,11 ± 0,45	15,29 ± 0,52*
«Бифидумбактерин»	18,25 ± 0,41	16,00 ± 1,02*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению со средой Блаурокка

Данные, полученные при проведении теста ингибирования билюминесценции свидетельствуют, что препарат «Имбикапс» на основе иммобилизованных бифидобактерий обладает определенным преимуществом по биологической активности в сравнении с аналогичными отечественными пробиотиками. Он превосходит аналоги по антагонистической составляющей, выраженной в виде индекса антагонистической активности, соответствующего уровню (%) подавления свечения тест-штамма. Преимущества «Имбикапс» можно объяснить тем, что в технологии изготовления препарата предусмотрено полное сохранение экзацеллюлярного комплекса, обуславливающего антагонистическую активность.

При проведении теста ингибирования билюминесценции было выявлено несколько вариантов развития реакции подавления свечения индикаторного штамма *E. coli lum*⁺ при воздействии пробиотиков.

Бифидобактерии в составе препарата «Имбикапс» в начале совместной экспозиции подавляли билюминесценцию сенсора на 86 %, через 2 ч отмечено снижение ИАА до 71 %, после 2-х ч ИАА увеличивается, достигая 98 % к 24 ч совместной экспозиции. У «Бифидумбактерина форте» отмечена динамика в сторону снижения ИАА с 75 % в начале экспозиции до 6 % к 6 ч, после наступала фаза стимуляции свечения сенсора (прирост > 75 % в сравнении с уровнем свечения в контрольном образце). Бифидумбактерин весь период совместной

экспозиции проявлял низкий уровень подавления свечения – с начала экспозиции и до 4 ч ИАА не превышал 40 %, после 4-х часов ИАА уменьшался до 15 % (рис. 7) [154].

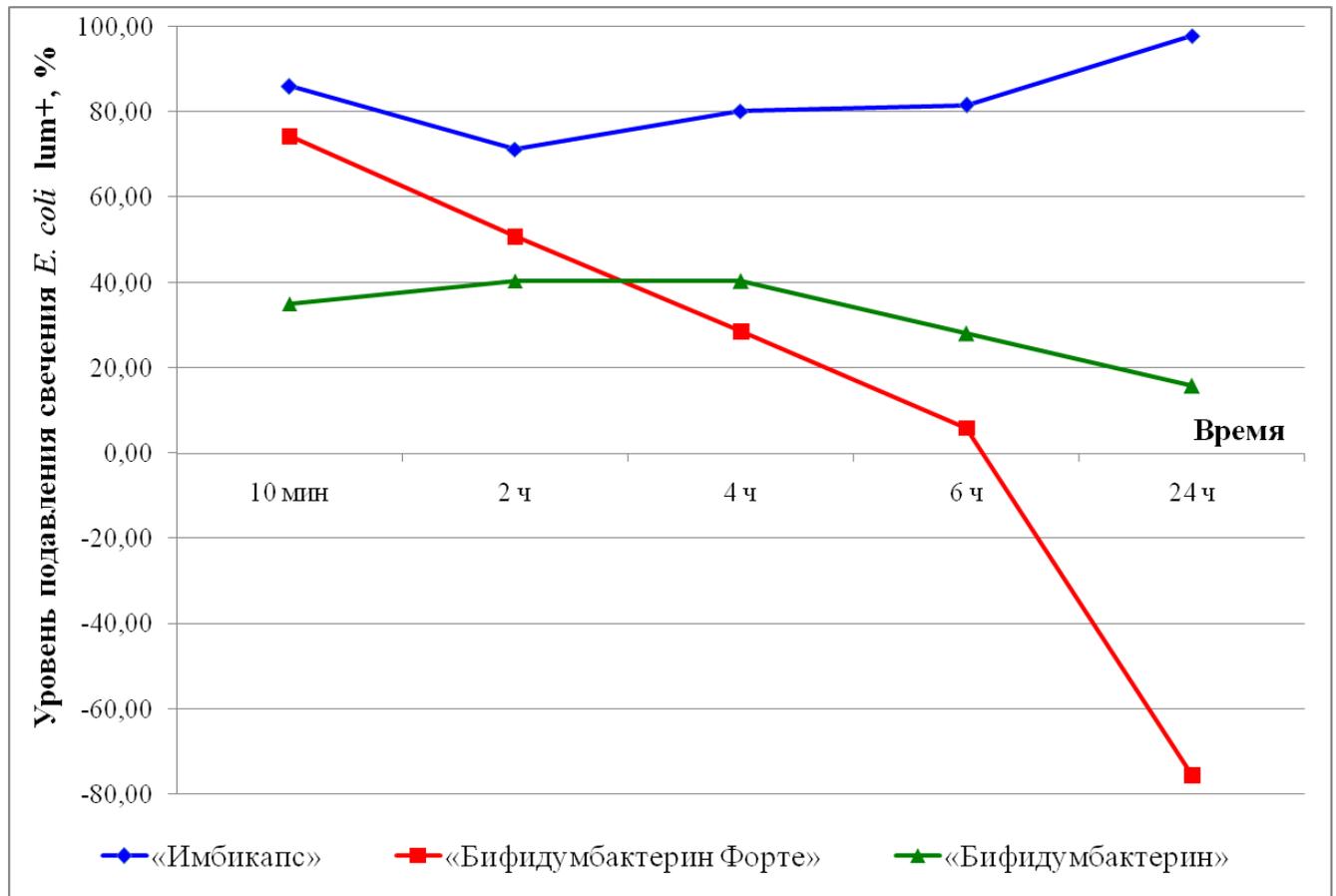


Рисунок 7 – Влияние препаратов на билюминесценцию *E. coli lum⁺*

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что иммобилизованные бифидобактерии не уступают, а в ряде случаев обладают определенными преимуществами по биологической активности в сравнении с несорбированными клетками.

5.5 Технологическая схема производства капсулированной лекарственной формы пробиотика «Имбикапс»

На основании проведенного исследования была разработана технологическая схема производства препарата «Имбикапс» (рис. 8).

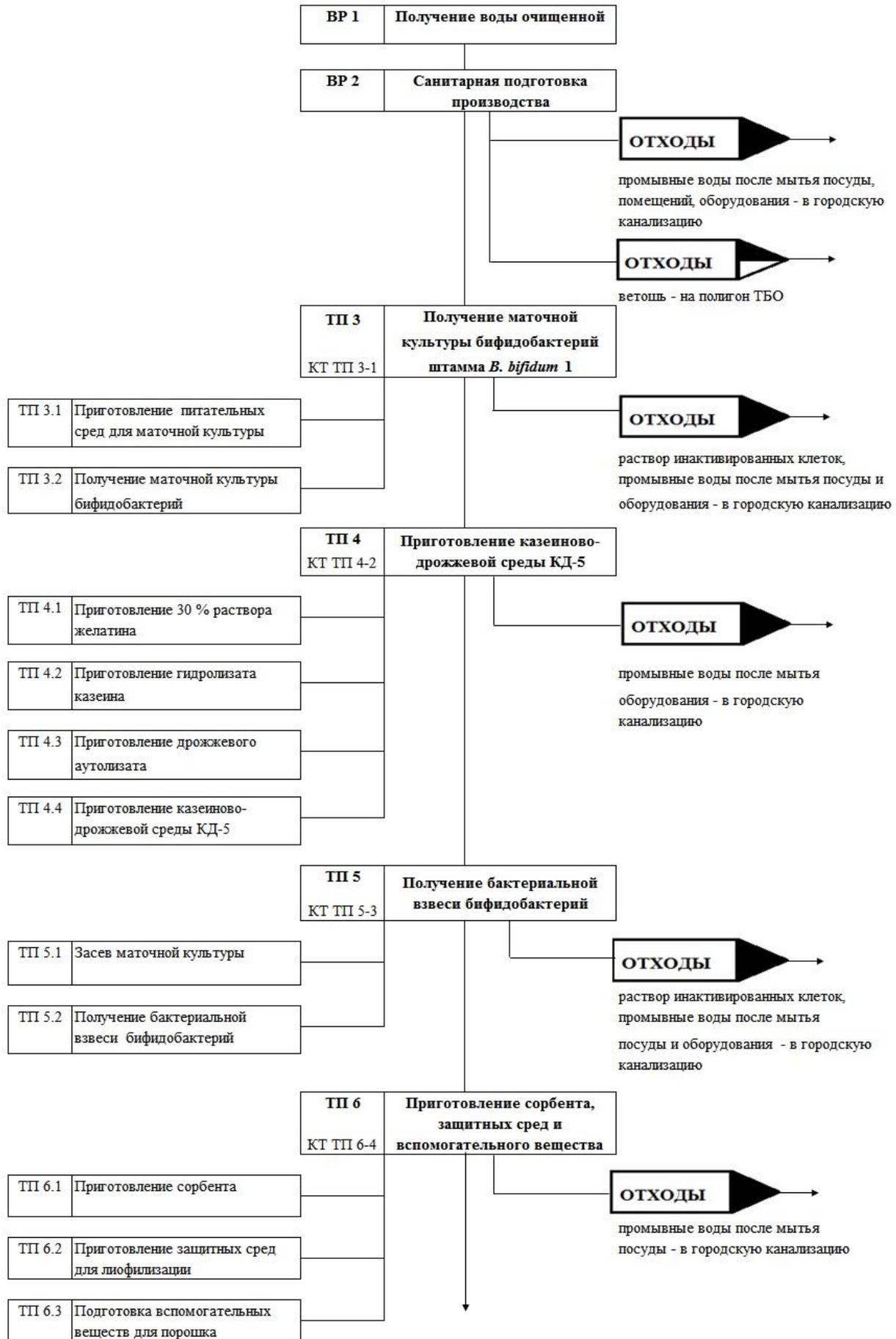


Рисунок 8 – Технологическая схема производства «Имбакапс»

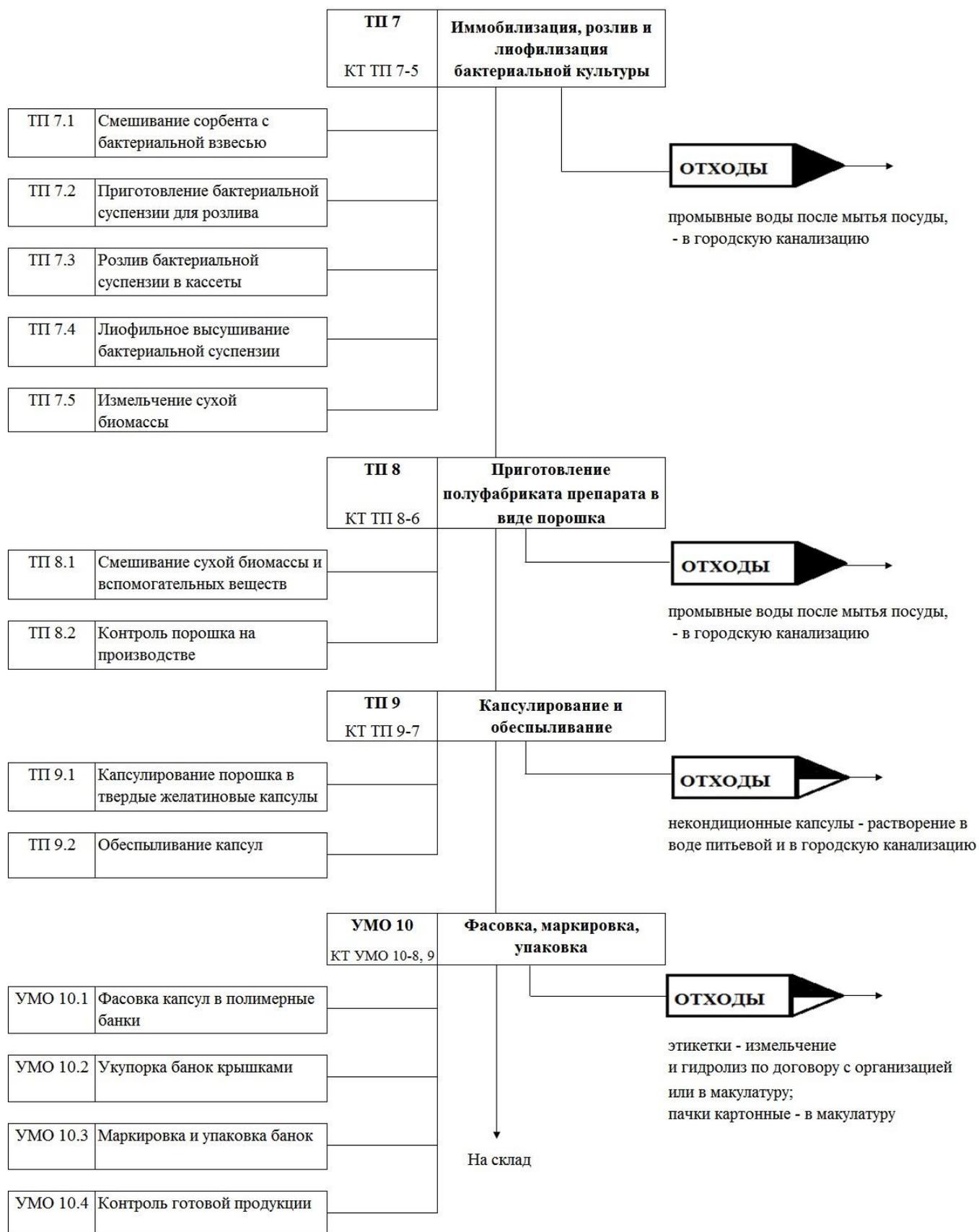


Рисунок 8 – Технологическая схема производства «Имбакапс» (продолжение)

Процесс производства препарата включает 10 стадий:

- 1 стадия – Получение воды очищенной;
- 2 стадия – Санитарная подготовка производства;
- 3 стадия – Получение маточной культуры бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1;
- 4 стадия – Приготовление казеиново-дрожжевой среды КД-5;
- 5 стадия – Получение бактериальной взвеси бифидобактерий;
- 6 стадия – Приготовление сорбента, защитных сред и вспомогательного вещества;
- 7 стадия – Иммобилизация, розлив и лиофилизация бактериальной культуры;
- 8 стадия – Приготовление полуфабриката препарата в виде порошка;
- 9 стадия – Капсулирование и обеспыливание;
- 10 стадия – Фасовка, маркировка, упаковка.

Вспомогательные операции (ВР 1, ВР 2) проводят в соответствии с общими действующими регламентированными правилами.

ТП 3 Получение маточной культуры бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1.

В асептических условиях (в боксе) вскрывают флакон с лиофилизированной культурой штамма *B. bifidum* 1 и проводят ряд последовательных пассажей с использованием среды Блаурокка и (или) казеиново-дрожжевой среды КД-5. Посевы (в пробирках, флаконах, бутылках) инкубируют в термокомнате при температуре (38 ± 1) °С.

Маточную культуру контролируют в производственном подразделении по показателю отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (КТ ТП 3-1).

ТП 4 Приготовление казеиново-дрожжевой среды КД-5.

В реактор наливают последовательно: воду очищенную, гидролизат казеина и дрожжевой аутолизат. Затем вносят расчетное количество натрия хлорида, агара, цистина и корректируют рН раствором натрия гидроксида 20 % до рН среды $(7,6 \pm 0,1)$. После этого в реактор вносят необходимое количество раствора желатина 30 %. Содержимое реактора перемешивают и стерилизуют при

температуре 110 °С и давлении 0,05 МПа в течение 30 мин. После стерилизации казеиново-дрожжевую среду с помощью стерильного шланга перекачивают в реактор-культиватор.

Среду КД-5 контролируют в производственном подразделении по следующим показателям: рН, аминный азот, стерильность (КТ ТП 4-2).

ТП 5 Получение бактериальной взвеси бифидобактерий.

В реактор-культиватор с казеиново-дрожжевой средой КД-5 с соблюдением требований асептики производят засев маточной культуры. Одновременно вводят раствор глюкозы 40 % и устанавливают рН ($6,6 \pm 0,5$) с помощью раствора аммиака 10 %. Культивирование проводят в течение (22 ± 4) ч при температуре (38 ± 2) °С в атмосфере азота с периодическим перемешиванием. Полученную бактериальную взвесь из реактора выгружают в стерильные бутылки и хранят при температуре (5 ± 3) °С.

Бактериальную взвесь контролируют по следующим показателям: рН, количество живых бифидобактерий, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (КТ ТП 5-3).

ТП 6 Приготовление сорбента, защитных сред и вспомогательного вещества.

Рабочее разведение сорбента разливают по бутылкам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110 °С и давлении 0,05 МПа в течение 30 мин. Необходимое количество каолина рассыпают тонким слоем (2-3 мм) в кассеты из нержавеющей стали и стерилизуют в сухожаровом шкафу при температуре 180 °С в течение 20 мин. После стерилизации каолин ссыпают в стерильные емкости и герметизируют.

Для приготовления СЖ среды необходимое количество желатина заливают водой очищенной и нагревают при периодическом перемешивании до полного расплавления желатина. В металлические бачки фильтруют необходимое количество раствора желатина. В пищеварочный котел наливают воду очищенную, вносят необходимое количество сахара-рафинада, перемешивают, кипятят, затем добавляют раствор желатина и кипятят 15 мин. Готовую среду

фильтруют, разливают по бутылкам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110 °С и давлении 0,05 МПа в течение 30 мин.

Приготовление обезжиренного молока: в пищеварочный котел заливают необходимое количество воды очищенной, подогревают и вносят расчетное количество сухого обезжиренного молока. Содержимое котла тщательно перемешивают до полного растворения сухого молока и устанавливают рН ($6,6 \pm 0,1$) с помощью раствора натрия гидроксида 20 %. Обезжиренное молоко разливают по бутылкам и стерилизуют при температуре 110 °С и давлении 0,05 МПа в течение 30 мин.

Рабочее разведение сорбента, каолин, СЖ среду и обезжиренное молоко контролируют по показателю стерильность (КТ ТП 6-4).

ТП 7 Иммобилизация, розлив и лиофилизация бактериальной культуры.

В асептических условиях сорбент вносят в бактериальную взвесь в соотношении 1:2 соответственно, перемешивают и добавляют защитную среду. Суспензию бифидобактерий доводят до гомогенного состояния на шуттель-аппарате в течение (20 ± 5) мин.

Полученную суспензию разливают в металлические кассеты по (0,5–0,6) л, высота слоя разлитой микробной суспензии должна быть не более 15 мм. Во время розлива бактериальную суспензию контролируют на отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (КТ ТП 7-5). Кассеты накрывают колпаками из бязи и металлическими крышками, помещают в морозильную камеру и замораживают при температуре минус (50 ± 5) °С не менее 16 ч. Замороженную бактериальную суспензию помещают в сублимационный аппарат и высушивают в течение (50 ± 6) ч до остаточного содержания влаги не более 3,5 %. В асептических условиях сухую биомассу иммобилизованных бифидобактерий извлекают из кассет и обрабатывают в измельчителе.

ТП 8 Приготовление полуфабриката в виде порошка.

Измельченную биомассу загружают в V-образный смеситель, туда же добавляют расчетное количество каолина. Полученную смесь перемешивают в смесителе до однородности в течение (30 ± 10) мин. Полученный порошок

выгружают в стерильные емкости из нержавеющей стали (или мешки из термоустойчивой ткани, помещенные в стерильные емкости) и хранят плотно закрытыми до операции капсулирования в холодильной камере при температуре (5 ± 3) °С не более 15 сут.

Полученный порошок контролируют в производственном подразделении по следующим показателям: рН, количество живых бифидобактерий, активность кислотообразования, потеря в массе при высушивании, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (КТ ТП 8-6).

ТП 9 Капсулирование и обеспыливание.

В асептических условиях порошок загружают в приемный бункер капсулонаполнительной машины. Производят настройку машины на необходимую массу порошка и фасуют в ТЖК № 2. Наполненные капсулы собирают в емкости из нержавеющей стали. По мере накопления достаточного количества капсул, их подвергают полировке и обеспыливанию на обеспыливателе. В процессе работы следят за качеством получаемых капсул и периодически проводят контроль средней массы капсул, распадаемости, внешнего вида капсул (блестящая поверхность, отсутствие запыленности и деформаций) (КТ ТП 9-7). Готовые капсулы помещают в контейнеры и хранят при температуре (5 ± 3) °С до операции фасовки препарата в банки.

УМО 10 Фасовка, маркировка, упаковка.

Капсулы фасуют в полимерные банки в необходимом количестве на счётно-фасовочной машине. Укупорка полимерных банок крышками с силикагелевой вставкой производится на укупорочной машине, где банки укупоривают полимерными винтовыми крышками с силикагелевой вставкой и кольцом контроля первого вскрытия.

В процессе работы следят за точностью фасовки и периодически проводят контроль соответствия количества капсул в банке (КТ УМО 10-8).

Маркировка потребительской упаковочной единицы и транспортной тары производится в соответствии с Техническим регламентом Таможенного союза ТР

ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки», ГОСТ Р 51074 и СанПиН 2.3.2.1290-03.

На каждую банку клеится этикетка на этикетировочной машине, с одновременным нанесением следующей информации: номер партии, дата изготовления, срок годности. В процессе работы контролируют качество и правильность маркировки на этикетке (КТ УМО 10-8). На этикетке потребительской упаковки (банки) указывают наименование предприятия-изготовителя, город производителя, название препарата, количество капсул в упаковке, условия хранения.

Полимерные банки с препаратом укладывают по 1 штуке в пачки, изготовленные из картона для потребительской тары. Пачки упаковывают в ящики из гофрокартона. В процессе упаковки банок в картонные пачки проводят проверку правильности и соответствия маркировки на пачке и этикетке (номер партии, дата изготовления, срок годности) (КТ УМО 10-8).

Готовый препарат контролируют в отделе контроля качества предприятия (КТ УМО 10-9).

Контрольные точки, предусмотренные на всех стадиях производства, препарата представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Перечень важнейших контрольных точек производства

Наименование стадии	Наименование объекта контроля	Наименование контролируемого параметра, единицы измерений	Регламентированный норматив	Методы контроля
1	2	3	4	5
ТП 3 Получение маточной культуры бифидобактерий штамма <i>B. bifidum</i> 1 КТ ТП 3-1	Маточная культура	Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	Отсутствие бактерий-контаминантов, дрожжевых и плесневых грибов	Микробиологический, ОФС.1.2.4.0002.15
ТП 4 Приготовление казеиново-дрожжевой среды КД-5 КТ ТП 4-2	Казеиново-дрожжевая среда КД-5	рН Аминный азот, % Стерильность	От 7,0 до 7,4 От 0,125 до 0,155 Отсутствие роста микроорганизмов и грибов	Потенциометрический, ОФС.1.2.0004.15 Титриметрический, ОФС 1.2.3.0022.15 Микробиологический, ОФС.1.2.4.0003.15
ТП 5 Получение бактериальной взвеси бифидобактерий КТ ТП 5-3	Бактериальная взвесь бифидобактерий	рН Количество живых бифидобактерий в 1 мл, КОЕ/мл Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	От 6,5 до 7,5 Не менее 10 ⁸ Отсутствие бактерий-контаминантов, дрожжевых и плесневых грибов	Потенциометрический, ОФС.1.2.0004.15 Бактериологический, ОФС.1.7.2.0009.15 (метод 2.2) Микробиологический, ОФС.1.2.4.0002.15
ТП 6 Приготовление сорбента защитных сред и вспомогательного вещества КТ ТП 6-4	Рабочее разведение сорбента, каолин, СЖ среда, обезжиренное молоко	Стерильность	Отсутствие роста микроорганизмов и грибов	Микробиологический, ОФС.1.2.4.0003.15
ТП 7 Розлив бактериальной суспензии в кассеты КТ ТП 7-5	Бактериальная суспензия	Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	Отсутствие бактерий-контаминантов, дрожжевых и плесневых грибов	Микробиологический, ОФС.1.2.4.0002.15

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5
ТП 8 Приготовление полуфабриката в виде порошка КТ ТП 8-6	Порошок для наполнения капсул	рН Количество живых бифидобактерий в 1 г, КОЕ/г Активность кислотообразования, °Т Потеря в массе при высушивании, % Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	От 5,5 до 6,5 Не менее 5×10^8 Не ниже 90 Не более 3,5 Отсутствие бактерий-контаминантов, дрожжевых и плесневых грибов	Потенциометрический, ОФС.1.2.0004.15 Бактериологический, ОФС.1.7.2.0009.15 (метод 2.2) Метод кислотно-основного титрования, ОФС.1.7.2.0009.15 Гравиметрический, ОФС.1.2.1.0010.15 Микробиологический, ОФС.1.2.4.0002.15
ТП 9 Капсулирование и обеспыливание КТ ТП 9-7	Капсулы с препаратом	Средняя масса капсулы, г Распадаемость, мин Внешний вид	От 0,29 до 0,33 Не более 20 Поверхность блестящая, отсутствие запыленности и деформаций	Весовой, ОФС.1.4.2.0009.15 Визуальный, ОФС.1.4.2.0013.15 Визуальный
УМО 10 Фасовка, маркировка, упаковка КТ УМО 10-8	Банки с препаратом, банки с препаратом в пачке	Количество капсул в банке, шт Качество расположения этикетки на банке, правильность и соответствие маркировки на этикетке и на пачке	40 или 60 Номер партии, дата изготовления, срок годности	Визуальный
УМО 10 Фасовка, маркировка, упаковка КТ УМО 10-9	Готовый препарат	Описание	Твердые желатиновые капсулы цилиндрической формы с полусферическими концами с сухим порошком бежевого или беловато-серого цвета с редкими темными вкраплениями со специфическим запахом.	Органолептический

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5
УМО 10 Фасовка, маркировка, упаковка КТ УМО 10-9	Готовый препарат	Подлинность	В мазках, окрашенных по Граму, должны быть неподвижные грамположительные полиморфные палочки длиной 4-5 мкм с бифуркацией на одном или двух концах, располагающиеся в виде скоплений или отдельных клеток	Микроскопический, ОФС.1.7.2.0012.15
		рН	От 5,5 до 6,5	Потенциометрический, ОФС.1.2.0004.15
		Потеря в массе при высушивании, %	Не более 3,5	Гравиметрический, ОФС.1.2.1.0010.15
		Средняя масса капсулы, г	От 0,29 до 0,33	Весовой, ОФС.1.4.2.0009.15
		Распадаемость, мин	Не более 20	Визуальный, ОФС.1.4.2.0013.15
		Количество живых бифидобактерий в 1 г, КОЕ/г	Не менее 5×10^8	Бактериологический, ОФС.1.7.2.0009.15 (метод 2.2)
		Активность кислотообразования, °Т	Не ниже 90	Метод кислотно-основного титрования, ОФС.1.7.2.0009.15
		Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов.	Отсутствие бактерий-контаминантов, дрожжевых и плесневых грибов	Микробиологический, ОФС.1.2.4.0002.15

На основании положительных результатов изучения стабильности качественных параметров препарата на протяжении предполагаемого срока годности можно сделать вывод о пригодности разработанной рецептуры и технологии капсульной формы препарата на основе иммобилизованных клеток для внедрения в производство. На препарат «Имбикапс» разработан и утвержден пакет НД (ТУ, ТИ) и получено свидетельство о государственной регистрации (приложение А).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Апробированные органические сорбенты природного происхождения обеспечивают высокий процент (более 90) иммобилизации клеток, но при этом они в различной степени оказывают защитное действие в отношении бифидо- и лактобактерий в моделируемых условиях ЖКТ, а также структурирующий эффект при лиофилизации бактериальных культур во флаконах (лекарственная форма – лиофилизат во флаконе).

2. Изучены биологические, физико-химические и технологические параметры сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий. Экспериментально доказано, что сорбенты на основе бурых водорослей (ламинарии и фукуса) обладают выраженными протективными свойствами в условиях *in vitro*, имитирующих пищеварение в желудке и кишечнике человека. Данные сорбенты, а также сорбенты, оказывающие менее выраженный протективный эффект (альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные клетчатка, полифепан, семена льна и крахмал прежелатинизированный) можно считать пригодными для производства пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток.

3. Установлено, что каолин в качестве вспомогательного вещества в количестве 20 % от массы лиофилизата иммобилизованных бифидобактерий обеспечивает получение стабильного порошка для капсулирования с приемлемыми технологическими свойствами.

4. Разработан состав и технология получения пробиотического препарата в капсулах «Имбикапс» на основе иммобилизованных бифидобактерий. Определены параметры его специфической активности. Подготовлен и утвержден пакет НД (ТУ, ТИ) на производство данного препарата, получено свидетельство о государственной регистрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. НД ЛС-002098-071117. Лактобактерин. Лактобактерии лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. – Введ. 07.11.17 до 07.11.22. – [Б. м., б. г.]. – 20 с.
2. ФСП ЛС-002159-020916. Бифидумбактерин. Бифидобактерии бифидум лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. – Введ. 02.09.16 до 02.09.21. – [Б. м., б. г.]. – 22 с.
3. Аксенов, В. А. Применение пробиотиков при воспалительных заболеваниях кишечника, болезнях печени и инфекционных заболеваниях / В. А. Аксенов, Е. Л. Никонов // Доказат. гастроэнтерология. – 2017. – № 2. – С. 35–45.
4. Алехина, Г. Г. Пробиотики – новый подход к старым проблемам / Г. Г. Алехина, А. Н. Суворов // Успехи соврем. естествознания. – 2007. – № 6. – С. 36–39.
5. Амерханова, А. М. Бифидобактерии как основа для создания иммунобиологических препаратов / А. М. Амерханова // Новые лекарств. препараты. – 2004. – № 3. – С. 39–43.
6. Аминина, Н. М. Биологическая ценность морских водорослей дальневосточного побережья / Н. М. Аминина // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки вод. биоресурсов. – 2010. – № 3. – С. 32–35.
7. Аминина, Н. М. Пребиотические свойства альгинатсодержащих продуктов переработки водорослей / Н. М. Аминина, Е. Л. Конева, Е. Л. Якуш // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки вод. биоресурсов. – 2010. – № 3. – С. 51–53.
8. Андреева, И. В. Когда следует назначать пробиотики? / И. В. Андреева // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 279–282.
9. Ардатская, М. Д. Пре- и пробиотики в коррекции микробиологических нарушений кишечника / М. Д. Ардатская // Фарматека. – 2011. – № 12. – С. 62–68.

10. Ардатская, М. Д. Пробиотики в лечении функциональных заболеваний кишечника // М. Д. Ардатская, О. Н. Минушкин // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2012. – № 3. – С. 106–113.
11. Ардатская, М. Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микробиологических нарушений кишечника / М. Д. Ардатская // Мед. совет. – 2015. – № 13. – С. 94–99.
12. Асташкина, А. П. Современные взгляды на биологическую роль бифидо- и лактобактерий / А. П. Асташкина // Вестн. ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2010. – № 1. – С. 133–139.
13. Ахременко, Я. А. Колонизационная резистентность – универсальный механизм противомикробной защиты / Я. А. Ахременко, О. П. Бочкарева, Е. П. Красноженов // Пробл. соврем. науки. – 2013. – Вып. 7, ч. 2. – С. 104–115.
14. Байбаков, В. И. Новый кислотоустойчивый штамм *V. bifidum* 791 БАГ как основа БАД и заквасок / В. И. Байбаков, А. В. Молокеев, Л. Т. Карих // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга : материалы 13-го Междунар. Славяно-Балтийского науч. форума «Санкт-Петербург – Гастро-2007». – 2007. – № 1–2. – С. А21.
15. Барановский, А. Ю. Дисбактериоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. А. Кондрашина. – Санкт-Петербург : Питер, 2008. – 240 с.
16. Барышникова, Н. В. Антибиотики и пробиотики: обеспечение эффективности и безопасности / Н. В. Барышникова, Л. Н. Белоусова // Врач. – 2012. – № 1. – С. 26–28.
17. Барышникова, Н. В. Эффективность использования монотерапии пробиотиками для эрадикации *Helicobacter pylori* / Н. В. Барышникова // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2012. – № 2–3. – С. М7.
18. Белова, И. В. Использование цеолитов в составе иммобилизованных мультипробиотиков // И. В. Белова // Мед. альм. – 2014. – № 2 (32). – С. 74–77.
19. Берсенева, Т. А. Кислотоустойчивость пробиотиков / Т. А. Берсенева, А. С. Берская // Новая наука: проблемы и перспективы : материалы Междунар.

(заоч.) науч.-практ. конф., 17 марта 2016 г., Кишинев. – Нефтекамск, 2016. – С. 60–64.

20. Биологические свойства сорбентов и перспективы их применения / Ю. И. Бородин [и др.] // Успехи соврем. биологии. – 2014. – Т. 134, № 3. – С. 236–248.

21. Блат, С. Ф. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / С. Ф. Блат, И. А. Хавкин // Рос. вест. перинатологии и педиатрии. – 2011. – Т. 56, № 1. – С. 159–174.

22. Богадельников, И. В. Микробиота – невидимый орган человеческого организма / И. В. Богадельников, Н. И. Мужецкая, Ю. В. Вяльцева // Здоровье ребенка. – 2011. – № 8 (35). – С. 118–122.

23. Бондаренко, В. М. О совершенствовании пробиотических препаратов / В. М. Бондаренко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2008. – № 2–3. – С. 24.

24. Бондаренко, В. М. Обоснование и тактика назначения в медицинской практике различных форм пробиотических препаратов / В. М. Бондаренко // Фарматека. – 2012. – № 13. – С. 77–87.

25. Бондаренко, В. М. Оценка микробиоты и пробиотических штаммов с позиций новых научных технологий / В. М. Бондаренко, О. В. Рыбальченко // Фарматека. – 2016. – № 11. – С. 21–33.

26. Бондаренко, В. М. Терапевтический эффект пробиотиков / В. М. Бондаренко, О. В. Рыбальченко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2009. – № 1. – С. 2–3.

27. Бродский, И. Б. Проверка устойчивости штаммов пробиотических бактерий *B. bifidum* № 1 и *L. plantarum* 8P-A3 к желудочному соку и желчным кислотам / И. Б. Бродский // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2013. – № 2. – С. М6.

28. Булгаков, С. А. Дисбактериоз кишечника как следствие антибиотикотерапии и его коррекция пробиотиками / С. А. Булгаков // Фарматека. – 2013. – № 2. – С. 36–40.

29. Булгаков, С. А. Профилактика и терапия дисбиотических нарушений кишечника применением пробиотических средств / С. А. Булгаков // Фарматека. – 2015. – № 10. – С. 16–19.

30. Бурмистров, В. А. Нормальная микрофлора и ее значение для здоровья человека. Препараты для профилактики и лечения дисбактериозов / В. А. Бурмистров. – Новосибирск : Вектор-Вита, 2009. – 19 с.

31. Бухарин, О. В. Взаимодействие *Bifidobacterium bifidum* с представителями нормальной микрофлоры в микросимбиозе кишечника человека / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова, Е. В. Иванова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 4. – С. 51–56.

32. Быков, А. Т. Микробиота кишечника. Вклад в здоровье, развитие и профилактику заболеваний человека / А. Т. Быков, А. В. Шапошников, Т. Н. Маляренко // Мед. журн. – 2016. – № 4 (58). – С. 16–26.

33. Вахитов, Т. Я. Концепция суперорганизма в биологии и медицине / Т. Я. Вахитов, С. И. Ситкин // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2014. – № 7 (107). – С. 72–85.

34. Вахитов, Т. Я. Современные подходы к регуляции состава микробиоты кишечника / Т. Я. Вахитов, С. И. Ситкин, Е. В. Демьянова // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2018. – № 2. – С. 4–5.

35. Влияние иммобилизации на биологические свойства лактобактерий [Электронный ресурс] / М. Г. Столбова [и др.] // Современ. пробл. науки и образования. – 2018. – № 4. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27975>.

36. Влияние пробиотического продукта, содержащего бифидобактерии и биогель из бурых водорослей, на кишечную микрофлору и показатели врожденного иммунитета у мышей с экспериментальным лекарственным дисбактериозом кишечника / Т. А. Кузнецова [и др.] // Вопр. питания. – 2015. – Т. 84, № 1. – С. 73–79.

37. Влияние продуктов переработки бурых водорослей на адгезивные свойства *Bifidobacterium bifidum*, штамм 791 / Е. Л. Конева, В. Е. Терехова, Е. В. Якуш. Н. М. Аминина // Биотехнология. – 2015. – Т. 31, № 3. – С. 64–70.
38. Влияние стресса на свойства лактобактерий / С. М. Шайхин [и др.] // Новости науки Казахстана. – 2017. – № 2 (132). – С. 42–78.
39. Воеводина, Ю. А. Оценка биологических свойств новых штаммов пробиотических микроорганизмов / Ю. А. Воеводина, С. В. Шестакова, Е. Н. Закрепина // Вестн. Бурят. гос. сельскохозяйств. акад им. В. Р. Филиппова. – 2016. – № 1 (42). – С. 59–63.
40. Возможности использования нанонитей на основе поливинилпирролидона для иммобилизации клеток *Lactobacillus acidophilus* / О. Я. Березина, Н. П. Маркова, А. В. Семенов, Н. А. Сидорова // Изв. ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2018. – Т. 8, № 2. – С. 69–76.
41. Возможности пробиотической терапии в гастроэнтерологии / О. И. Соловьева [и др.] // Вестн. Санкт-Петербург. мед. акад. последиплом. образования. – 2011. – Т. 3, № 4. – С. 69–80.
42. Воловик, Т. Н. Оптимизация параметров процесса инкапсулирования пробиотических культур / Т. Н. Воловик, Л. В. Капрельянц // Пищевая наука и технология. – 2014. – Т. 28, № 3. – С. 19–22.
43. Выживаемость бифидобактерий и лактобактерий в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей / И. Ю. Чичерин [и др.] // Мед. альм. – 2012. – № 1(20). – С. 57–59.
44. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных / И. В. Дармов [и др.] // Журн. инфектологии. – 2012. – Т. 4, № 1. – С. 68–74.
45. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека / И. В. Дармов, И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2011. – № 03. – С. 6–11.

46. Выживаемость пробиотиков из кисломолочных продуктов разных марок в условиях, имитирующих пищеварение / С. В. Андреева [и др.] // Вестн. Челяб. гос. ун-та. Биология. – 2013. – № 7 (298), вып. 2. – С. 64–65.
47. Гаммель, И. В. Исследование ассортимента лекарственных средств в твердых желатиновых капсулах / И. В. Гаммель, С. А. Горбунова // Мед. альм. – 2018. – № 1 (52). – С. 121–125.
48. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Москва : Практика, 1999. – 459 с.
49. Глушанова, Н. А. Биологические свойства лактобацилл / Н. А. Глушанова // Бюл. сиб. медицины. – 2003. – № 4 – С. 50–58.
50. Государственная Фармакопея СССР. – 10-е изд. – Москва : Медицина, 1968. – 1076 с.
51. Гунина, Л. М. Механизмы влияния пробиотика «Ламинолакт» на физическую работоспособность спортсменов высокой квалификации / Л. М. Гунина // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М22–М23.
52. Гунина, Л. М. Современные пробиотические функциональные продукты в практике подготовки спортсменов / Л. М. Гунина // Наука в олимпийском спорте. – 2015. – № 3. – С. 26–33.
53. Двухштаммовый пробиотик бифилактрин в лечении острых кишечных инфекций у детей / Н. П. Куприна [и др.] // Науч.-мед. вестн. Центрального Черноземья. – 2002. – № 9. – С. 96–102.
54. Действие биогеля из морских водорослей на облигатную микрофлору кишечника / Н. М. Аминина, Е. Л. Конева, Л. С. Бузолева, В. В. Подусенко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2009. – № 4–5 (39–40). – С. 20–23.
55. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция / М. Д. Ардатская [и др.] // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2015. – № 117 (5). – С. 13–50.
56. Дисбиоз кишечника и принципы его коррекции / А. И. Дядык [и др.] // Новости медицины и фармации. – 2012. – № 419. – С. 50–60.

57. Дорошенко, Е. О. Новый отечественный поликомпонентный препарат – пробиотик Флорин® форте / Е. О. Дорошенко // Поликлиника. – 2007. – № 2. – С. 108–109.
58. Евсютина, Ю. В. Пробиотики в профилактике и лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта / Ю. В. Евсютина // Рос. мед. журн. – 2018. – № 3. – С. 18–22.
59. Егорова, Т. С. Устойчивость лактобацилл препарата «Витафлор» к пищеварительным сокам и ферментам желудочно-кишечного тракта в модельных экспериментах *in vitro* / Т. С. Егорова, Т. Я. Вахитов, Л. А. Прокофьева // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2018. – № 2. – С. 63.
60. Ермоленко, Е. И. Антимикробное действие лактобацилл / Е. И. Ермоленко, О. В. Рыбальченко // Медицина. XXI век. – 2007. – № 5 (6). – С. 41–48.
61. Ефремова, К. А. К вопросу устойчивости иммобилизованных бифидобактерий к биологическим жидкостям / К. А. Ефремова, М. Г. Столбова // Вестн. Перм. гос. фармац. акад. – 2012. – № 9. – С. 225–227.
62. Забоклицкий, Н. А. Краткий обзор современного состояния рынка фармакологических препаратов (отечественных и импортных) на основе пробиотических бактерий / Н. А. Забоклицкий // Здоровье и образование в XXI веке. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 3–15.
63. Захаренко, С. М. Роль микробиоты в жизни человека и перспективы профилактического применения пробиотиков / С. М. Захаренко // Мед. совет. – 2017. – № 15. – С. 61–67.
64. Защитные функции микрофлоры кишечника / С. А. Крамарев, О. В. Выговская, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент // Новости медицины и фармации. Гастроэнтерология. – 2008. – № 251. – С. 62–67.
65. Значение лактобактерий в организме человека и тактика правильного выбора эубиотика / И. Б. Ершова, Л. И. Гаврыш, Е. Н. Кунегина, А. А. Мочалова // Здоровье ребенка. – 2008. – № 1(10). – С. 51–54.

66. Изучение эффективности бифидосодержащего пробиотика «Кальцидум» у детей / Л. В. Феклисова, Л. В. Титова, И. В. Щепина, Т. В. Мацулевич // Дет. инфекции. – 2004. – № 1. – С. 27–30.
67. Иммуобилизованные клетки и ферменты. Методы / под ред. Д. Вудворда. – Москва : Мир, 1988. – 216 с.
68. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов / А. П. Сеницын [и др.]. – Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1994. – 288 с.
69. Использование ламинакта в коррекции дисбиоза кишечника у пациентов с хроническими заболеваниями печени / П. В. Селиверстов [и др.] // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2010. – № 2–3. – С. 82.
70. Использование сорбента Сфероцелл при конструировании иммуобилизованного пробиотика / В. М. Бондаренко [и др.] // Журн. микробиологии эпидемиологии и иммунологии. – 2009. – № 5. – С. 66–69.
71. Исследование антагонистической активности и жизнеспособности клеток лактобацилл, иммуобилизованных на карбонизованном сорбенте / И. С. Савицкая, А. С. Кистаубаева, К. Нигметова, Н. В. Воронова // Вестн. КазНУ. Серия Биологическая. – 2012. – Т. 4, № 56. – С. 110–114.
72. Исследование пребиотического потенциала биологически активных веществ из морских гидробионтов и разработка новых продуктов функционального питания / Т. А. Кузнецова [и др.] // Вестн. ДВО РАН. – 2011. – № 2. – С. 147–150.
73. Исследование пребиотического потенциала полисахаридов из бурой водоросли *F. evanescens* в экспериментах *in vitro* и *in vivo* / Т. А. Кузнецова, Т. С. Запорожец, Т. П. Смолина, Т. Н. Звягинцева // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М46–М47.
74. Кислотоустойчивость пробиотических штаммов, включаемых в кисломолочные продукты / Е. С. Шигина, Т. А. Берсенева, И. С. Полянская, В. Ф. Семенихина // Молочная пром-сть. – 2016. – № 7. – С. 30–31.

75. Кистаубаева, А. С. Биотехнология получения иммобилизованного пробиотического препарата Рисо-Лакт : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / Кистаубаева Аида Сериковна. – Астана, 2009. – 22 с.

76. Кистаубаева, А. С. Использование сорбентов нового поколения для иммобилизации молочнокислых бактерий / А. С. Кистаубаева // Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане : сб. ст. Междунар. науч. конф. – Алматы, 2010. – С. 302–305.

77. Кистаубаева, А. С. Создание иммобилизованного пробиотического препарата нового поколения / А. С. Кистаубаева // Материалы XVII Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». – Москва, 2011 – С. 178.

78. Китаевская, С. В. Современные тенденции отбора и идентификации пробиотических штаммов молочнокислых бактерий / С. В. Китаевская // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2012. – Т. 15, № 17. – С. 184–188.

79. Кишечная микробиота: современные представления / Е. М. Булатова, Н. М. Богданова, Е. А. Лобанова, Т. В. Габруская // Педиатрия. – 2009. – Т. 87, № 3. – С. 104–110.

80. Клиническая и бактериологическая эффективность препарата пробифор у недоношенных детей с дисбактериозом кишечника / М. В. Кушнарера [и др.] // Педиатрия. – 2003. – № 1. – 59–62.

81. Кожевников, А. А. Участие кишечной микробиоты в процессах метаболизма, старения и перспективы применения имеющихся данных в реальной клинической практике / А. А. Кожевников // Рус. мед. журн. Мед. обозрение. – 2017. – № 2. – С. 98–105.

82. Кожевникова, Е. Н. Микрофлора кишечника как орган иммунитета / Е. Н. Кожевникова, Л. И. Елезова, С. В. Николаева // Педиатрия. – 2014. – № 3. – С. 15–19.

83. Конева, Е. Л. Бифидогенные свойства продуктов переработки бурых водорослей / Е. Л. Конева, Н. М. Аминина, Е. В. Якуш // Изв. ТИНРО. – 2010. – Т. 161. – С. 303–308.

84. Конева, Е. Л. Использование биогеля «Ламиналь» в технологии в технологии молочных и кисломолочных продуктов / Е. Л. Конева, Т. И. Вишневская, Н. М. Аминина // Изв. ТИНРО. – 2009. – Т. 156. – С. 335–340.

85. Конева, Е. Л. Пробиотические продукты на основе биогеля из морских водорослей / Е. Л. Конева, Н. М. Аминина, Е. В. Якуш // Изв. ТИНРО. – 2009. – Т. 158. – С. 361–365.

86. Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика / И. В. Соловьева [и др.] // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. – 2012. – № 2 (3). – С. 85–92.

87. Корвякова, Е. Р. Эффективность применения препарата «Гепатор[®]» в лечении вирусных гепатитов / Е. Р. Корвякова, Е. О. Дорошенко, Л. Г. Пятова // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2010. – № 2–3. – С. М45.

88. Корниенко, Е. А. Микробиота желудка и возможности пробиотиков в эрадикации *H. pylori* / Е. А. Корниенко, Н. И. Паролова // Фарматека. – 2017. – № 13. – С. 22–29.

89. Корочинский, А. В. Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков / А. В. Корочинский, В. В. Верниковский, Э. Ф. Степанова // Успехи соврем. естествознания. – 2010. – № 5. – С. 34–38.

90. Коррекция дисбиотических нарушений при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени биологически активными добавками с пробиотическим действием / Н. В. Соловьева [и др.] // Обзоры клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2010. – Т. 8, № 3. – С. 48–57.

91. Коррекция микробиоциноза у детей раннего возраста с последствиями перинатальной патологии / Т. В. Турти [и др.] // Педиатр. фармакология. – 2009. – Т. 6, № 5. – С. 61–64.

92. Кузнецова, Э. Э. Микробиота кишечника. Роль в развитии различных патологий // Э. Э. Кузнецова, В. Г. Горохова, С. Л. Богородская // Клинич. лаборатор. диагностика. – 2016. – Т. 61, № 10. – С. 723–726.

93. Кульчицкая, М. А. БАД синбиотик «ЛВ-Ламинария» / М. А. Кульчицкая, М. А. Моисеева, Ю. И. Гришина // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М48.
94. Кульчицкая, М. А. БАД синбиотики «Альгилак» и «Альгибиф» / М. А. Кульчицкая // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М48.
95. Ланских, А. Г. Исследование устойчивости пробиотических бактерий, входящих в состав препаратов «Флорин форте» порошок для приема внутрь, «Бифидумбактерин» и «Пробифор» к желудочному соку и желчным кислотам / А. Г. Ланских // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2013. – № 3–4. – С. М8.
96. Макаров, К. А. Имобилизованные биопрепараты в медицине / К. А. Макаров, С. А. Кибардин. – Москва : Медицина, 1980. – 128 с.
97. Максименя, Г. Г. Выбор препаратов пробиотиков для профилактики и лечения в педиатрической практике / Г. Г. Максименя // Мед. журн. – 2013. – № 2 (44). – С. 19–26.
98. Мацулевич, Т. В. Эффективность гепатопробиотика «Гепафор®» в лечении токсического лекарственного гепатита / Т. В. Мацулевич, Е. О. Дорошенко, Т. Р. Багдасарян // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М57.
99. Машарова, А. А. Современные критерии выбора эффективной пробиотикотерапии / А. А. Машарова, Н. Н. Данилевская // Мед. совет. – 2018. – № 12. – С. 52–59.
100. Метаболомика – новый подход к диагностике заболеваний на молекулярном уровне / Е. А. Калинина [и др.] // Лечение и профилактика. – 2013. – № 2 (6). – С. 117–124.
101. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис, Т. А. Брилене, Х. П. Ленцнер, А. А. Ленцнер // Лаборатор. дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
102. Микроэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками / А. А. Воробьев [и др.] // Вестн. РАМН. – 2004. – № 2. – С. 13–17.

103. Минушкин, О. Н. Дисбактериоз (дисбиоз) кишечника: современное представление, диагностика и лечебная коррекция : учеб.-метод. пособие для врачей и курсантов циклов усовершенствования врачей / О. Н. Минушкин, М. Д. Ардатская. – Москва, 2008. – 50 с.

104. Минушкин, О. Н. Нарушение баланса микрофлоры и ее коррекция / О. Н. Минушкин, Г. А. Елизаветина, М. Д. Ардатская // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – № 41. – С. 16–20.

105. Молокеев, А. В. Системный подход к разработке эффективных БАД-пробиотиков / А. В. Молокеев // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2007. – № 1–2. – С. А54.

106. Молочные продукты с биогелем из морских водорослей / Т. И. Вишневская, Н. М. Аминина, В. М. Соколова, Е. Л. Конева // Молочная пром-сть. – 2009. – № 7. – С. 58–59.

107. Мухина, Ю. Г. Влияние микрофлоры на функции желудочно-кишечного тракта / Ю. Г. Мухина, П. В. Шумилов, М. Г. Ипатова // Фарматека. – 2013. – № 1. – С. 37–42.

108. Некоторые аспекты сублимационного высушивания биоматериалов / А. А. Нежута, Е. С. Сербис, А. А. Диденко, С. И. Головлева // Фармац. технологии и упаковка. – 2012. – № 4. – С. 38–40.

109. Немцов, В. И. Нарушения состава кишечной микрофлоры и метаболический синдром / В. И. Немцов // Клинико-лаборатор. консилиум. – 2010. – № 1 (32). – С. 4–12.

110. Несчисляев, В. А. Изучение устойчивости лакто- и бифидобактерий к биологическим жидкостям / В. А. Несчисляев, И. В. Фадеева, В. Б. Моховикова // Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов : материалы Всерос. науч. конф. – Томск, 2004. – С. 130–132.

111. Несчисляев, В. А. Пробиотики: микробиологические и технологические аспекты получения, контроля и конструирования препаратов :

дис. ... д-ра мед. наук : 03.00.07 / Несчисляев Валерий Александрович. – Пермь, 2005. – 277 с.

112. Несчисляев, В. А. Пробиотики на основе иммобилизованных лактобактерий: апробация перспективных сорбентов / В. А. Несчисляев, М. Г. Столбова, К. А. Лыско // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2015. – № 5, вып. 117. – С. 102.

113. Несчисляев, В. А. Разработка и исследование капсулированной лекарственной формы пробиотика «Имбакапс» [Электронный ресурс] / В. А. Несчисляев, М. Г. Столбова, П. А. Мокин // Современ. пробл. науки и образования. – 2014. – № 2. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/116-12686>.

114. Несчисляев, В. А. Сравнительное изучение биологических свойств нового комплексного пробиотика и препаратов-аналогов / В. А. Несчисляев, И. В. Фадеева // Перм. мед. журн. – 2004. – № 1. – С. 87–90.

115. Несчисляев, В. А. Унификация технологии получения и контроля препаратов для бактериотерапии с использованием питательных сред из непищевого сырья : дис. ... канд. мед. наук / Несчисляев Валерий Александрович. – Пермь, 1989. – 147 с.

116. Николаев, В. Г. Современные энтеросорбенты и механизм их действия / В. Г. Николаев, С. В. Михаловский, Н. М. Гурина // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11, № 4. – С. 3–17.

117. Николаева, С. В. Роль молочнокислых бактерий в здоровье человека / С. В. Николаева // Лечащий врач. – 2013. – № 2. – С. 78–80.

118. Николаева, Т. Н. Иммуностимулирующая и антиканцерогенная активность нормальной лактофлоры кишечника / Т. Н. Николаева, В. В. Зорина, В. М. Бондаренко // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2004. – № 4. – С. 39–43.

119. Новик, Г. И. Бифидобактерии: научные основы практического использования / Г. И. Новик // Пробл. здоровья и экологии. – 2006. – № 3 (9). – С. 144–151.

120. Новые аспекты применения альгинатсодержащего биогеля из бурых водорослей в технологии пробиотиков / Е. В. Якуш [и др.] // Изв. ТИНРО. – 2017. – Т. 190. – С. 204–211.

121. Новиков, В. Е. Фармакологическая регуляция микробиоценоза кишечника / В. Е. Новиков // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 51–57.

122. Новокшенов, А. А. Физиологические функции лактобактерий в организме и эффективность их применения в составе пробиотиков в педиатрической практике / А. А. Новокшенов, Н. В. Соколова // Эпидемиология и инфекции. – 2012. – № 1. – С. 52–56.

123. Новые аспекты применения альгинатсодержащей продукции из водорослей в лечебно-профилактическом питании / Н. М. Аминина, Е. Л. Конева, Е. В. Якуш, Л. Н. Бочаров // Онкология – XXI век : материалы XX Междунар. науч. конф. по онкологии. – Пермь, 2016. – С. 39–45.

124. Нынь, И. В. Настоящее и будущее пробиотической микробиологии / И. В. Нынь, А. М. Королюк // Изв. Санкт-Петербург. гос. техн. ин-та (техн. ун-та). – 2008. – № 3. – С. 70–74.

125. Обоснование необходимости инкапсулирования пробиотиков / А. К. Какимов, А. Е. Бепеева, Ж. Х. Какимова, В. В. Хуторянский // Вестн. Алматин. технол. ун-та. – 2016. – № 2. – С. 86–89.

126. Пат. 2187801 Российская Федерация. Способ определения антагонистической активности пробиотиков : пат. на изобретение / В. А. Несчисляев [и др.] ; Перм. НПО «Биомед». – № 2000118391/14 ; заявл. 10.07.00 ; опубл. 20.08.2002.

127. Постадийный контроль в производстве таблеток / М. Б. Вальтер, О. Л. Тютеньков, Н. А. Филиппин. – Москва : Медицина, 1982. – 208 с.

128. Преимущества применения нового отечественного комбинированного биопрепарата «Бифилактрин», содержащего представителей облигатной микрофлоры кишечника / Н. П. Куприна [и др.] // Науч.-мед. вестн. Центрального Черноземья. – 2003. – № 13. – С. 114–117.

129. Применение биосовместимых сорбентов для конструирования иммобилизованных пробиотиков / В. М. Бондаренко [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2008. – № 4 (32). – С. 20–22.

130. Пробиотики в схемах лечения заболеваний толстой кишки: возможности аутопробиотической терапии / О. И. Соловьева, В. И. Симаненков, И. А. Шумихина, Д. А. Свиридо // Фарматека. – 2016. – № S5–16. – С. 48–54.

131. Пробиотики и пребиотики в клинической практике / И. В. Маев [и др.] // Фарматека. – 2011. – № 5. – С. 33–41.

132. Пробиотический препарат на основе наноструктурированных сорбентов / И. С. Савицкая, А. С. Кистаубаева, А. А. Жубанова, А. А. Кожалакова // XXI век: фармацевтическое производство, научные исследования в области здравоохранения и предоставление медицинских услуг в странах СНГ на современном этапе : материалы междунар. науч. симпозиума. – Вашингтон, 2008. – С. 110–111.

133. Продукты с пробиотиками – важное составляющее функционального питания / Е. Н. Кожевникова, Д. В. Усенко, С. В. Николаева, Л. И. Елезова // Педиатрия. – 2012. – Т. 91, № 4. – С. 72–78.

134. Привольнев, В. В. Новые данные о роли пробиотиков в восстановлении поврежденной антибиотиками микрофлоры кишечника / В. В. Привольнев, С. М. Захаренко, И. В. Андреева // Лечение и профилактика. – 2016. – № 3 (19). – С. 39–48.

135. Промышленная технология лекарств : учебник : в 2 т. Т. 2 / В. И. Чуешов [и др.]. – Харьков : НФАУ МТК-Книга, 2002. – 716 с.

136. Разработка и клиническая оценка пробиотика «Бифидумбактерин форте» / А. В. Григорьев [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1997. – № 3. – С. 92–96.

137. Результаты многоцентрового исследования применения комбинированного препарата-пробиотика у больных респираторными инфекционными заболеваниями / Л. В. Феклисова [и др.] // Дет. инфекции. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 53–56.

138. Руженцова, Т. А. Роль пробиотиков в формировании иммунитета / Т. А. Руженцова // Лечащий врач. – 2018. – № 4. – С. 27.

139. Сабельникова, Е. А. Клинические аспекты дисбактериоза кишечника / Е. А. Сабельникова // Клинич. фармакология. – 2011. – № 3. – С. 111–116.

140. Савицкая, И. С. Определение эффективности пробиотического действия лактобацилл, иммобилизованных на наноструктурированных сорбентах / И. С. Савицкая, А. А. Жубанова, А. С. Кистаубаева // Биотехнология. Теория и практика. – 2007. – № 3. – С. 63–68.

141. Сафонова, М. А. Пробиотические препараты для коррекции микрoэкологических нарушений кишечника / М. А. Сафонова, О. Ю. Кузнецов // Вест. Ивановской мед. акад. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 49–54.

142. Симаненков, В. И. Язвенный колит: место пробиотической терапии / В. И. Симаненков, О. И. Соловьева, З. Р. Сундукова // Вестн. Северо-Западного гос. мед. ун-та им. И. И. Мечникова. – 2012. – Т. 4, № 3. – С. 29–36.

143. Ситкин, С. И. Метаболический дисбиоз и его биомаркеры / С. И. Ситкин, Е. И. Ткаченко, Т. Я. Вахитов // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2015. – № 12 (124). – С. 6–29.

144. Ситкин, С. И. Филометаболическое ядро микробиоты и метаболический дисбиоз кишечника / С. И. Ситкин, Е. И. Ткаченко, Т. Я. Вахитов // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2015. – № 3–4. – С. М12–М13.

145. Ситкин, С. И. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника / С. И. Ситкин, Е. И. Ткаченко, Т. Я. Вахитов // Альм. клинич. медицины. – 2015. – № 40. – С. 12–34.

146. Скворцов, В. В. Актуальные вопросы диагностики и лечения дисбиоза кишечника / В. В. Скворцов, Е. М. Скворцова, А. А. Зотова // Мед. совет. – 2012. – № 9. – С. 58–62.

147. Современные бактериологические препараты: влияние на микробиоту кишечника и роль в лечении заболеваний / К. В. Раскина, Е. Ю. Мартынова, И. Р. Фатхутдинов, Ю. Е. Потешкин // Рус. мед. журн. – 2018. – № 5 (II). – С. 86–91.

148. Соколова, С. И. Применение лактобактерина, иммобилизованного на коллагене, в комплексном лечении хронического катарального гингивита у детей с гуморальными иммунодефицитными состояниями : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.21, 14.00.16 / Соколова Светлана Игоревна. – Москва, 2007. – 25 с.

149. Сорбированные пробиотики. Перспективы развития / В. Д. Болотов [и др.] // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – Москва, 2008. – С. 27.

150. Состав и возможности использования бурых водорослей дальневосточных морей / Н. М. Аминина, Т. И. Вишневецкая, О. Н. Гурулева, Л. Т. Ковековдова // Вестн. ДВО РАН. – 2007. – № 6. – С. 123–130.

151. Специфические сорбенты для профилактики и лечения различных заболеваний / В. А. Бурмистров [и др.] // Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины : сб. материалов науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Новосибирск, 2007. – Ч. 2. – С. 23–36.

152. Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов в условиях *in vitro* / И. В. Дармов [и др.] // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2011. – № 9. – С. 96–101.

153. Сравнительная характеристика адсорбционных свойств энтеросорбентов / В. А. Филиппова, А. В. Лысенкова, В. А. Игнатенко, А. К. Довнар // Пробл. здоровья и экологии. – 2016. – № 1 (47). – С. 41–46.

154. Столбова, М. Г. Сравнительный анализ антагонистической активности пробиотических препаратов на основе иммобилизованных бифидобактерий / М. Г. Столбова, В. А. Несчислаев // Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке : материалы конф. – Пермь, 2018. – С. 220–224.

155. Технологические аспекты производства бифидумбактерина / М. И. Демешева, Л. Н. Мезенцева, Т. Д. Лимарева, Е. В. Князюк // Сиб. мед. журн. – 2009. – № 2. – С. 71–76.

156. Ткаченко, Е. И. Гастроэнтерология XXI века с позиций многомерной биологии / Е. И. Ткаченко, Л. С. Орешко, С. И. Ситкин // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2012. – № 2–3. – С. 2–4.

157. Ткаченко, Е. И. Клиническая микробиология с позиций многомерной биологии. Роль микробиоты в лечении и профилактике заболеваний в XXI веке / Е. И. Ткаченко // Профилактикт. и клинич. медицина. – 2011. – № 3 (40). – С. 76–79.

158. Ткаченко, Е. И. Новое учение – клиническая микробиология. Одиннадцать основных принципов структурно-функциональной организации микробиоты / Е. И. Ткаченко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 4. – С. М34–М35.

159. Ткаченко, Е. И. Парадигма дисбиоза в современной гастроэнтерологии. Роль микробиоты в лечении и профилактике заболеваний в XXI веке / Е. И. Ткаченко // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2014. – № 5 (105). – С. 4–8.

160. Урсова, Н. И. Актуальные и нерешенные проблемы пробиотикотерапии / Н. И. Урсова // Лечащий врач. – 2013. – № 08. – С. 60–65.

161. Урсова, Н. И. Практические подходы к оптимизации микробной экологии пищеварительного тракта у детей / Н. И. Урсова // Фарматека. – 2017. – № 11. – С. 14–21.

162. Усенко, Д. В. К вопросу о роли пробиотических продуктов в профилактике заболеваний и сохранении здоровья человека / Д. В. Усенко // Лечащий врач. – 2011. – № 7. – С. 74–78.

163. Успенский, Ю. П. Клиническое значение нарушений микробиоценоза кишечника / Ю. П. Успенский, Е. В. Балукова // Фарматека. – 2014. – № 2. – С. 61–65.

164. Утебаева, А. А. Перспективы использования бифидобактерий в продуктах функционального питания и лекарственных средствах / А. А. Утебаева, М. А. Бурмасова, М. А. Сысоева // Изв. ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 100–109.

165. Феклисова, Л. В. Новое поколение сорбированных бифидосодержащих пробиотиков в педиатрической практике / Л. В. Феклисова, Е. Р. Мескина // Альм. клинич. медицины. – 2005. – № 8–1. – С. 329–338.

166. Функ, И. А. Биотехнологический потенциал бифидобактерий / И. А. Функ, А. Н. Иркитова // Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Т. 2, № 4. – С. 67–79.

167. Функция микрофлоры кишечника и ее участие в регуляции иммунных процессов организма человека : (обзор литературы) / В. В. Кузьменко [и др.] // Науч.-мед. вестн. Центрального Черноземья. – 2008. – № 34. – С. 107–115.

168. Хасанова, Е. Е. Безопасное лечение дисбактериоза кишечника у детей раннего возраста с помощью синбиотиков «Пробифор» и «Флорин форте» / Е. Е. Хасанова // Практ. медицина. – 2008. – № 6 (30). – С. 112–113.

169. Хурса, Р. В. Кишечная микрофлора: роль в поддержании здоровья и развитии патологии, возможности коррекции : учеб.-метод. пособие / Р. В. Хурса, И. Л. Месникова, Я. С. Микша. – Минск : БГМУ, 2017. – 36 с.

170. Целипанова, Е. Е. Коррекция дисбиотических нарушений у детей, больных острыми респираторными заболеваниями / Е. Е. Целипанова, Е. В. Русанова // Альм. клинич. медицины. – 2015. – № 42. С. 66–71.

171. Циммерман, Я. С. Альтернативные схемы эрадикационной терапии и пути преодоления резистентности *Helicobacter pylori* к проводимому лечению / Я. С. Циммерман // Клинич. медицина. – 2004. – № 4. – С. 9–15.

172. Циммерман, Я. С. Дисбиоз («дисбактериоз») кишечника и/или синдром избыточного бактериального роста / Я. С. Циммерман // Клинич. медицина. – 2005. – № 4. – С. 14–22.

173. Циммерман, Я. С. Эубиоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: мифы и реалии / Я. С. Циммерман // Клинич. медицина. – 2013. – Т. 91, № 1. – С. 4–11.

174. Чаплин, А. В. Микробиом человека / А. В. Чаплин, Д. В. Ребриков, М. Н. Болдырева // Вестн. Рос. гос. мед. ун-та. – 2017. – № 2. – С. 5–13.

175. Чистохина, Л. П. Иммунобиологическая характеристика препарата «Микростим» на основе метаболитов лактобактерий : дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Чистохина Лариса Павловна. – Пермь, 2004. – 171 с.

176. Шабашова, Н. В. Микробиоценоз и внутриэпителиальная иммунная система желудочно-кишечного тракта человека / Н. В. Шабашова // Вестн. Санкт-Петербург. мед. акад. последиплом. образования. – 2011. – Т. 3, № 2. – С. 166–178.

177. Шевелева, С. А. Использование имитационной модели пищеварения в комплексной оценке пробиотических штаммов / С. А. Шевелева, С. Ю. Батищева, И. Б. Куваева // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2007. – № 1–2. – С. А74–А75.

178. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1 : Микрофлора человека и животных и ее функции / Б. А. Шендеров. – Москва : Гранд, 1998. – 288 с.

179. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 2 : Социально-экологические и клинические последствия дисбаланса микробной экологии человека и животных / Б. А. Шендеров. – Москва : Гранд, 1998. – 414 с.

180. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3 : Пробиотики и функциональное питание / Б. А. Шендеров. – Москва : Гранд, 2001. – 287 с.

181. Ширококов, В. П. Энтеросорбенты на основе смектита и их влияние на микробную экологию человека : (обзор литературы) / В. П. Ширококов, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент // Здоровье женщины. – 2013. – № 6. – С. 53–57.

182. Шишов, Г. В. Современные сорбированные пробиотики «Пробифор» и «Флорин форте» в клинической практике / Г. В. Шишов // Мед. альм. – 2008. – № 2. – С. 78–80.

183. Шульпекова, Ю. О. Кисломолочные бактерии: роль в регуляции кишечной перистальтики / Ю. О. Шульпекова // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – № 3. – С. 68–73.

184. Шульпекова, Ю. О. Пробиотики и продукты функционального питания / Ю. О. Шульпекова // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 70–79.

185. Эффективность комбинированного препарата-пробиотика в стартовой терапии острых кишечных инфекций у детей / Л. В. Феклисова [и др.] // Дет. инфекции. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 42–46.

186. Юринова, Г. В. Нарушения симбиотических взаимоотношений макроорганизм – микробиота и методы их коррекции : (обзор) / Г. В. Юринова, С. М. Попкова, С. И. Лещук // Изв. Иркут. гос. ун-та. Серия Биология. Экология. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 97–101.

187. Яковенко, Э. П. Антибиотики, пребиотики, пробиотики, метабиотики при избыточном бактериальном росте в тонкой кишке / Э. П. Яковенко // Трудный пациент. – 2018. – Т. 16, № 4. – С. 16–22.

188. Янковский, Д. С. Получение пробиотически ценных штаммов бифидобактерий / Д. С. Янковский, Г. С. Дымент, Е. П. Потребчук // Здоровье женщины. – 2008. – № 1. – С. 216–222.

189. Янковский, Д. С. Создание новых комплексных препаратов на основе биомассы пробиотических бактерий и геля смектита / Д. С. Янковский, В. Л. Ширококов, Г. С. Дымент // Профілактична медицина. – 2013. – № 3–4 (21). – С. 108–115.

190. Annan, N. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions / N. T. Annan, A. D. Borza, L. T. Hansen // Food Research International. – 2008. – Vol. 41, № 2. – P. 184–193.

191. Arslan-Tontul, S. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling / S. Arslan-Tontul, M. Erbas // LWT – Food Science and Technology. – 2017. – № 81. – P. 160–169.

192. Ashraf, R. Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains- tolerance to bile, pepsin and antibiotics / R. Ashraf, S. C. Smith // International Food Research Journal. – 2016. – Vol. 23, № 2. – P. 777–789.

193. Burgain, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications / J. Burgain, C. Gaiani, M. Linder, J. Scher // *Journal of Food Engineering*. – 2011. – № 104. – P. 467–483.

194. Campana, R. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion / R. Campana, S. van Hemert, W. Baffone // *Gut Pathogens*. – 2017. – № 9. – P. 1–12.

195. Cell viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* under freeze-drying, storage and gastrointestinal tract simulation conditions / F. Shamekhi, M. Shuhaimi, A. Ariff, Y.A. Manap // *Folia Microbiol (Praha)*. – 2013. – № 58 (2). – P. 91–101.

196. Chaikham, P. Spray drying probiotics along with maoluang juice plus Tiliacora triandra gum for exposure to the in vitro gastrointestinal environments / P. Chaikham, V. Kemsawasd, P. Seesuriyachan // *LWT – Food Science and Technology* – 2017. – № 78. – P. 31–40.

197. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice / S. Nualkaekul [et. al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – № 90 (3). – P. 1281–1287.

198. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12 / I. M. Fareez, S. M. Lim, R. K. Mishra, K. Ramasamy // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – № 72. – P. 1419–1428.

199. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment / S. Sathyabama [et al.] // *LWT – Food Science and Technology*. – 2014. – № 57 (1). – P. 419–425.

200. De Prisco, A. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool / A. De Prisco, G. Mauriello // *Trends in Food Science & Technology*. – 2016. – № 48. – P. 27–39.

201. Derrien, M. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota / M. Derrien, J. E. van Hylckama Vlieg // *Trends in Microbiology*. – 2015. – Vol. 23, № 6. – P. 354–366.

202. Ding, W. K. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria / W. K. Ding, N. P. Shah // *Journal of food science*. – 2007. – Vol. 72, № 9. – P. 446–450.

203. Ding, W. K. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage / W. K. Ding, N. P. Shah // *Journal of food science*. – 2009. – Vol. 74, № 2. – P. 53–60.

204. Ding, W. K. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria / W. K. Ding, N. P. Shah // *Journal of Food Science*. – 2009. – № 74 (2). – P. 100–107.

205. Doleyres, Y. Cell immobilization for the dairy industry / Y. Doleyres, C. Lacroix // *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology Focus on Biotechnology*. – 2005. – Vol. 8B. – P. 295–319.

206. Doleyres, Y. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection / Y. Doleyres, C. Lacroix // *International Dairy Journal*. – 2005. – № 15 (10). – P. 973–988.

207. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions / H. Gandomi [et al.] // *LWT. – Food Science and Technology*. – 2016. – № 69. – P. 365–371.

208. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 / Se-Jin Kim [et al.] // *LWT*. – 2008. – № 41. – P. 493–500.

209. Effect of process variables on particle size and viability of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in genipin-gelatin microspheres / N. T. Annan [et al.] // *Journal of Microencapsulation*. – 2007. – Vol. 24, № 2. – P. 152–162.

210. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate / M. A. Etchepare [et al.] // *LWT. – Food Science and Technology*. – 2016. – № 65. – P. 511–517.

211. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate / M. A. Etchepare [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2016. – № 21. – P. 321–329.

212. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice / I. Trabelsi [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – № 61. – P. 36–42.

213. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion / J. Burgain [et al.] // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2013. – № 19. – P. 233–242.

214. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system / T. Huq [et. al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2013. – № 53 (9). – P. 909–916.

215. Enhanced Acid Tolerance in *Lactobacillus casei* by Adaptive Evolution and Compared Stress Response during Acid Stress / J. Zhang, C. Wu, G. Du, J. Chen // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2012. – № 17. – P. 283–289.

216. Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using in-vitro gastro intestinal model and survivability studies of synbiotic microcapsules in dry food matrix during storage / S. Moumita [et al.] // LWT – Food Science and Technology. – 2017. – № 77. – P. 460–467.

217. Gbassi, G. K. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut / G. K. Gbassi, T. Vandamme // Pharmaceutics. – 2012. – № 4. – P. 149–163.

218. Gut microbiota in health and disease / I. Sekirov, S. L. Russell, L. C. Antunes, B. B. Finlay // Physiological Reviews Published. – 2010. – № 90 (3). – P. 859–904.

219. Heidebach, T. Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications / T. Heidebach, P. Först, U. Kulozik // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2012. – Vol. 52, №. 4. – P. 291–311.

220. Hooper, L. V. Interactions Between the Microbiota and the Immune System / L. V. Hooper, D. R. Littman, A. J. Macpherson // Science. – 2012. – Vol. 336. – P. 1268–1273.

221. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production [Electronic resource] / G. Mitropoulou, V. Nedovic, A. Goyal, Y. Kourkoutas // Journal of Nutrition and Metabolism. – 2013. – Режим доступа : <http://dx.doi.org/10.1155/2013/716861>.

222. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria / H. Jensen, S. Grimmer, K. Naterstad, L. Axelssona // International Journal of Food Microbiology. – 2012. – № 153 (1–2). – P. 216–222.

223. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions / P. Darjani, M. H. Nezhad, R. Kadkhodae, E. Milani // LWT. – 2016. – P. 162–167.

224. Iravani, S. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products / S. Iravani, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi // J. Food Sci. Technol. – 2015. – № 52 (8). – P. 4679–4696.

225. Jayalalitha, V. In vitro assessment of microencapsulated probiotic beads / V. Jayalalitha, B. Balasundaram, R. Palanidorai // International Journal of Agriculture : Research and Review. – 2012. – Vol. 2 (1). – P. 1–6.

226. Kemsawasd, V. Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model / V. Kemsawasd, P. Chaikham, P. Rattanasena // Food Bioscience. – 2016. – № 16. – P. 37–43.

227. Krasaekoopt, W. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice / W. Krasaekoopt, S. Watcharapoka // LWT – Food Science and Technology. – 2014. – № 57 (2). – P. 761–766.

228. Krasaekoopt, W. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt / W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth // International Dairy Journal. – 2003. – № 13 (1). – P. 3–13.

229. Krasaekoopt, W. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria / W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth // International Dairy Journal. – 2004. – № 14. – P. 737–743.

230. Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic product with increased acid tolerance / Y. Yonejima [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2015. – № 4 (4). – P. 773–777.

231. Lawley, T. D. Intestinal colonization resistance / T. D. Lawley, A. W. Walker // *Immunology*. – 2012. – № 138. – P. 1–11.

232. Liserre, A. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions / A. M. Liserre, M. I. Re, B. D. G. M. Franco // *Food Biotechnology*. – 2007. – № 21. – P. 1–16.

233. Mandal, S. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC298 / S. Mandal, A. K. Puniya, K. Singh // *International Dairy Journal*. – 2006. – № 16 (10) – P. 1190–1195.

234. Methods of Increasing Probiotic Survival in Food and Gastrointestinal Conditions [Electronic resource] / D. Maleki [et al.] // *Prensa Med Argent*. – 2015. – № 101 (4). – Режим доступа : <http://dx.doi.org/10.4172/lpma.1000154>.

235. Microencapsulation in food science and biotechnology / F. Nazzaro, P. Orlando, F. Fratianni, R. Coppola // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2012. – Vol. 23, Issue 2. – P. 182–186.

236. Microencapsulation of a probiotic and probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions / M. Chávarri [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2010. – № 142. – P. 185–189.

237. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects / M. J. Martín, F. Lara-Villoslada, M. A. Ruiz, M. E. Morales // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. – 2015. – № 27. – P. 15–25.

238. Microencapsulation of live probiotic bacteria / M. A. Islam, C. H. Yun, Y. J. Choi, C. S. Cho // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – № 20 (10). – P. 1367–1377.

239. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery / M. T. Cook, G. Tzortzis, D. Charalampopoulos, V. V. Khutoryanskiy // *Journal of Controlled Release*. – 2012. – № 162 (1). – P. 56–67.

240. Picot, A. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt / A. Picot, C. Lacroix // *International Dairy Journal*. – 2004. – № 14. – P. 505–515.

241. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications / L. O’Sullivan [et al.] // *Mar. Drugs*. – 2010. – № 8. – P. 2038–2064.

242. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion / P. F. de Palencia [et al.] // *Eur. Food Res. Technol.* – 2008. – № 227. – P. 1475–1484.

243. Recent Approaches in the Development of Encapsulated Delivery Systems for Probiotics / P. L. Teoh [et al.] // *Food Biotechnology*. – 2011. – Vol. 25, № 1. – P. 77–101.

244. Riaz, Q. U. Recent Trends and Applications of Encapsulating Materials for Probiotic Stability / Q.U. Riaz, T. Masud // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2013. – № 53(3). – P. 231–244.

245. Shori, B. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit / B. Shori // *HAYATI Journal of Biosciences*. – 2017. – № 24 (1). – P. 1–5.

246. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products / C. L. Ramos, L. Thorsen, R. F. Schwan, L. Jespersen // *Food Microbiology*. – 2013. – № 36 (1). – P. 22–29.

247. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile / R. P. K. Sahadeva [et al.] // *International Food Research Journal*. – 2011. – № 18 (4). – P. 1515–1522.

248. Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice / T. Faye, A. Tamburello, G. E. Vegarud, S. Skeie // *Journal of Dairy Science*. – 2012. – № 95 (2). – P. 558–566.

249. The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria / A. G. Peredo [et al.] // LWT – Food Science and Technology. – 2016. – № 73. – P. 191–196.

250. The gastrointestinal transit tolerance of *Lactobacillus plantarum* strain no. 14 depended on the carbon source / Y. Nagata [et al.] // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2009. – № 73. – P. 2650–2655.

251. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice / R. R. Mokarram, S. A. Mortazavi, M. B. Habibi Najafi, F. Shahidi // Food Research International. – 2009. – № 42 (8). – P. 1040–1045.

252. Vamanu, E. Effect of gastric and small intestinal digestion on lactic acid bacteria activity in a GIS1 simulator / E. Vamanu // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2017. – № 24. – P. 1453–1457.

253. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* under human gastrointestinal conditions simulated in vitro / K. C. Pacheco, G. V. del Toro, F. R. Martinez, E. Duran-Paramo // American Journal of Agricultural and Biological Sciences. – 2010. – № 5 (1). – P. 37–42.

254. Vidhyalakshmi, R. Encapsulation «The future of probiotic»: A review / R. Vidhyalakshmi, R. Bhakayaraj, R. S. Subhasree // Advances in biological Research. – 2009. – № 3 (3–4). – P. 96–103.

255. Walkera, A. W. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis / A. W. Walkera, T. D. Lawleyb // Pharmacological Research. – 2013. – № 69. – P. 75–86.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАД – биологически активная добавка

ВР – вспомогательная работа

ГФ – Государственная фармакопея

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИАА – индекс антагонистической активности

ИАМ – индекс адгезивности микроорганизма

КД – казеиново-дрожжевая питательная среда

КОЕ – колонеобразующие единицы

КТ – контрольная точка

КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

МИТ – микробиоллюминесцентный индикатор токсичности

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

МПА – мясо-пептонный агар

МРС – среда Мана, Рогозы, Шарпа

НД – нормативная документация

ОФС – общая фармакопейная статья

ПА – питательный агар

ПР – промышленный регламент

СЖ – сахарозо-желатиновая среда

СЖМ – сахарозо-желатино-молочная среда

СПА – средний показатель адгезии

СК – сахарозо-коллагеновая среда

СМ – сахарозо-молочная среда

ТБО – твердые бытовые отходы

ТЖК – твердые желатиновые капсулы

ТП – технологический процесс

ФС – фармакопейная статья

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Нормативная документация на препарат «Имбикапс»



**ТАМОЖЕННЫЙ СОЮЗ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
И РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации
Российская Федерация

уполномоченный орган Страны, руководитель уполномоченного органа, наименование административно-территориального образования)

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации**

№ RU.77.99.11.003.E.001352.01.12 от 20.01.2012 г.

Продукция:
биологически активная добавка к пище "Имбикапс" (капсулы массой 0,31 г). Изготовлена в соответствии с документами: ТУ 9197-161-14237183-2011. Изготовитель (производитель): ФГУП "НПО "Микроген" Минздравсоцразвития России, 115088, г. Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15 (адрес производства - филиал ФГУП "НПО "Микроген" Минздравсоцразвития РФ "Пермское "НПО "Биомед", 614089, г. Пермь, ул. Братская, д. 177), Российская Федерация. Получатель: ФГУП "НПО "Микроген" Минздравсоцразвития России, 115088, г. Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15, Российская Федерация.



наименование продукции, нормативные (или) технические документы, в соответствии с которыми изготовлена продукция, наименование и место нахождения изготовителя (производителя), государства)

соответствует
Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)

прошла государственную регистрацию, внесена в Реестр свидетельств о государственной регистрации и разрешена для производства, реализации и использования для реализации населению через аптечную сеть и специализированные магазины, отделы торговой сети в качестве биологически активной добавки к пище - дополнительного источника пробиотических микроорганизмов (бифидобактерий) (далее согласно приложению)

Настоящее свидетельство выдано на основании (перечислить рассмотренные протоколы исследований, наименование организации (испытательной лаборатории, центра), проводившей исследования, другие рассмотренные документы):
взамен свидетельства о государственной регистрации №RU.77.99.11.003.E.049669.12.11 от 06.12.2011, экспертное заключение НИИ питания РАМН №72/Э-1062/6-11 от 13.10.2011 г.

Срок действия свидетельства о государственной регистрации устанавливается на весь период изготовления продукции или поставок подконтрольных товаров на территорию таможенного союза

Подпись, ФИО, должность уполномоченного лица, выдавшего документ, и печать органа (учреждения), выдавшего документ




Г.Г. Онищенко
(Ф. И. О. подпись) М. П.

№0192278



ТАМОЖЕННЫЙ СОЮЗ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ, РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
И РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации
Российская Федерация

(уполномоченный орган Страны, руководитель уполномоченного органа, наименование административно-территориального образования)

ПРИЛОЖЕНИЕ
К СВИДЕТЕЛЬСТВУ О ГОСУДАРСТВЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ

№ RU.77.99.11.003.E.001352.01.12 ОТ 20.01.2012 г.

(информация, не вошедшая в текст свидетельства о государственной регистрации)

Область применения (продолжение, начало на бланке свидетельства):

Рекомендации по применению: взрослым и детям старше 14 лет по 2 капсулы 2 раза в день за 30 минут до еды или через 1,5 часа после еды. Продолжительность приема - не менее 20 дней. Срок годности - 18 месяцев в невскрытой заводской упаковке. Хранить при температуре не выше 10°C. Противопоказания: индивидуальная непереносимость компонентов продукта. Перед применением рекомендуется проконсультироваться с врачом.



Подпись, ФИО, должность уполномоченного лица, выдавшего документ, и печать органа (учреждения), выдавшего документ


Г.Г. Онищенко
(Ф. И. О. Подпись)
М. П.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ ПО МЕДИЦИНСКИМ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ «МИКРОГЕН»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(ФГУП «НПО «МИКРОГЕН» Минздравсоцразвития России)

ОКП 91 9769

Группа Р11
(ОКС 67.220.20)

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России
П.В. Смачков



» _____ 2011 г.

Биологически активная добавка к пище

«ИМБИКАПС»

Технические условия
ТУ 9197-161-14237183-2011
(вводятся впервые)

Дата введения в действие - 2012 г.

СОГЛАСОВАНО



РАЗРАБОТАНО

ФГУП «НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России

Москва
2011



УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора
 ФГУП «НПО «Микроген»
 Минздравсоцразвития России
 П.В. Смачков
 - 2011 г.



ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ	ТИ
По изготовлению биологически активной добавки к пище «Имбикапс» в капсулах	к ТУ 9197-161-14237183-11

Настоящая технологическая инструкция предусматривает изготовление биологически активной добавки к пище «Имбикапс» в твердых желатиновых капсулах, предназначенной для реализации населению.

1. СЫРЬЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для изготовления биологически активной добавки (БАД) «Имбикапс» используют сухую биомассу бифидобактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* 1, иммобилизованных на гомогенате бурых водорослей. Для получения сухой биомассы иммобилизованных бифидобактерий применяют:

Штамм <i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	- паспорт штамма, депонирован в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, № 100-1;
Ламинария гомогенизированная желированная для диетического (лечебного и профилактического) питания	- ТУ 9284-001-75351480-06;
или Продукт для диетического (лечебного) питания Фукус гомогенизированный желированный	- ТУ 9284-002-75351480-09;
или БАД «Фукодар С»	- ТУ 9284-005-75351480-09;
Желатин	- ГОСТ 11293;

Приложение Б. Акты внедрения

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора по производству
филиала АО «Микроген» в г. Пермь

«Пермское НПО «Биомед»,

И.А. Бахтин

« 24 » *Сентябрь* 2018 г.



АКТ

внедрения в производство отделения препаратов бактериотерапии и научного отдела филиала АО НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» результатов диссертационной работы Столбовой Марии Георгиевны «Разработка лекарственных форм пробиотиков на основе иммобилизованных клеток»

Разработана технология иммобилизации бифидо- и лактобактерий с использованием сорбентов на основе бурых водорослей (фукус, ламинария), обеспечивающих высокую степень защиты клеток от бактерицидного действия желудочного сока и желчи человека, что значительно увеличивает эффективность пробиотических препаратов. Указанная технология является универсальной и может быть рекомендована при разработке пробиотиков нового поколения (сорбированные препараты).

Разработан состав и технология получения пробиотического препарата в твердых желатиновых капсулах «Имбикапс» на основе бифидобактерий, иммобилизованных на гомогенате ламинарии. Разработка является интеллектуальной собственностью АО «Микроген».

Подготовлен и утвержден пакет нормативной документации (ТУ, ТИ) на производство данного препарата, получено свидетельство о государственной регистрации.

Результаты исследований, полученные при создании пробиотиков на основе иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, используются при планировании и реализации научной тематики предприятия, связанной с разработкой лекарственных средств с пробиотическим действием.

И.о. начальника объединённого цеха
филиала АО «Микроген» в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед», к.м.н.

Е.Г. Арчакова
Е.Г. Арчакова

Главный научный сотрудник
научного отдела филиала АО «Микроген»
в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», д.б.н.

А.М. Николаева
А.М. Николаева

Личные подписи Арчаковой Елены Геннадьевны и Николаевой Алевтины Максимовны заверяю:

Начальник отдела *А.М. Николаева*



УТВЕРЖДАЮ
 Ректор ФГБОУ ВО «Пермская государственная
 фармацевтическая академия» Минздрава России,
 доцент, к.ф.н.  А.Ю. Турышев
 2018 г.



**внедрения результатов диссертационной работы
 Столбовой Марии Георгиевны**

на тему «Разработка лекарственных форм пробиотиков на основе иммобилизованных клеток» в учебный процесс кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии.

Объект внедрения: результаты научных исследований соискателя Столбовой М.Г. по разработке технологии получения пробиотика в форме капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий.

Разработчики: соискатель Столбова М.Г., профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Несчислаев В.А.

Пользователи: студенты очного и заочного факультетов на лекции по теме «Пробиотики. Характеристика. Технология. Иммобилизация» и на практическом занятии «Ферменты. Иммобилизация» по курсу биотехнологии на кафедре промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии.

Когда внедрено: сентябрь 2018 года.

Эффективность внедрения: материалы диссертационной работы включены в лекционный материал и практическое занятие курса биотехнологии.

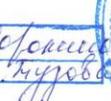
Зав. кафедрой промышленной технологии лекарств
 с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО ПГФА
 Минздрава России, профессор, д.ф.н.

Е.В. Орлова

Методист курса биотехнологии
 ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, к.ф.н.



Ю.В. Сорокина

Подпись
 заверяю:  
 (нач. отдела кадров) 