

УДК 616.981.452:59

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА  
ДЛЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ****THE DEVELOPMENT OF COMPLEX PROBIOTIC PREPARATION  
FOR PREVENTIVE-TREATMENT PURPOSES****О.С. Хижняк  
O.S. Khizhnyak***Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»  
Украина, 61002, г. Харьков, ул. Фрунзе, 21**National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute»  
Ukraine, 61002, Kharkov, Frunze St., 21**E-mail: Oksana.Khizhnyak@gmail.com*

**Ключевые слова:** пробиотические штаммы, бифидобактерии, лактобациллы, пребиотики, лактитол, симбиоз, глубинное культивирование, капсулы, кремния диоксид.

**Key words:** probiotic strains, bifidobacteria, lactobacilli, probiotics, lactitol, symbiosis, submerged cultivation, capsules, silicon dioxide.

**Аннотация.** В статье изложены данные о разработке состава и технология получения комплексного лечебно-профилактического препарата на основе пробиотических бактерий. Доказан симбиотический тип взаимодействия штаммов при глубинном культивировании. Симбиоз штаммов подтвержден высокими показателями активности кислотообразования и антагонистической активности. Установлено оптимальное количественное соотношение бактерий в инокуляте и необходимое содержание пребиотического компонента. Разработан состав лекарственной формы в виде капсул с учетом физико-химических особенностей бактериальной субстанции. Показано соответствие препарата предъявляемым технологическим требованиям.

**Resume.** The article presents data on the development of composition and technology of complex therapeutic and preventive medication based on probiotic bacteria. As a base formulation were selected lactobacilli and bifidobacteria. The symbiotic type of interaction strains at joint depth cultivation has been proved. The results are based on individual characteristics of each strain and their influence on each other.

The optimum quantitative ratio of bacteria in the inoculum and the required content of prebiotic component have been set. The ratio of the seed is selected so that the main growth indicators bacteria were at the highest level. As the prebiotic component selected lactitol, as he has expressed bifidobacteria and prolactin properties. In addition, experimentally proved that the presence of lactitol in the composition of the nutrient medium in small quantities, is not inferior to its effectiveness most popular prebiotic – lactulose. An important superiority is the fact that the use of lactitol patients do not perceive lactose and its derivatives, it is safe.

Designed composition dosage forms as capsules, considering the physic-chemical characteristics of bacterial substance. The capsule dosage form is facilitates the maximum protection of the bacteria from the aggressive environment of the stomach and extend the shelf-life of the active substance.

The results show that the complex therapeutic and preventive medication meets requirements.

---

**Введение**

Микрофлора кишечника человека играет значительную роль в нормализации газообмена, в обеспечении обновления клеток слизистой оболочки, в синтезе витаминов, в активации кишечных ферментов. Участвуя в переваривании пищи, она выводит из организма токсины, стимулирует работу лимфоидных клеток, защищающих организм от инфекций, поддерживает иммунитет и выполняет еще ряд других важных функций [Лукьянова, Антипкин, 2009]. Общепринятая терапевтическая тактика восстановления нормальной микрофлоры макроорганизма основана на комплексном использовании различных препаратов, среди которых ведущая роль отводится пробиотикам.

Пребиотики – биотехнологические препараты, которые содержат живые микроорганизмы, относящиеся к нормальной физиологически и эволюционно обоснованной флоре ЖКТ [Бондаренко, Грачева, 2003]. Количественное превосходство среди бактериальных культур в составе полезной микрофлоры принадлежит бифидобактериям и лактобациллам. Поэтому большинство препаратов-пробиотиков, представленных в торговой сети, содержат комбинации различных штаммов этих бак-



терий. Однако нами не обнаружены данные литературы, подтверждающие симбиотический характер взаимоотношений штаммов, входящих в состав конкретного препарата. Это положение является принципиально важным, так как если используется простая механическая смесь сухих бактериальных порошков определенных штаммов, то при реактивации их в какой-либо среде (в том числе в средах организма при энтеральном приеме пробиотика) может наблюдаться конкуренция между штаммами за источники питания. В итоге ожидаемый положительный эффект приема нескольких штаммов нивелируется или значительно снижается.

### Цель

Учитывая все недостатки отечественного производства комбинированных пробиотических препаратов, нами поставлена цель – разработка состава конкурентоспособного лечебно-профилактического препарата на основе пробиотических штаммов бактерий, выбор и обоснование лекарственной формы и технологии его производства.

При рациональном конструировании новых пробиотических препаратов необходимо учитывать количества различных штаммов в кишечнике, их физиологические особенности и способность выживать в агрессивных условиях (кислая среда желудка, желчные кислоты) для наиболее максимального попадания бактерий в соответствующие локусы при приеме *per os* [McCartney et al, 1996]. Также достаточно важным для увеличения эффективности препаратов является правильно подобранный для определенного консорциума пребиотический компонент, который является не только важным дополнением для препаратов-пробиотиков, но и источником питания для ослабленных представителей микрофлоры кишечника пациента.

### Материалы и методы исследования

Нами предложен препарат на основе консорциума бифидобактерий штамма *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 и лактобацилл штамма *Lactobacillus Plantarum* 8P-A3 с добавлением пребиотического компонента лактитол.

Для получения препарата лиофилизированный штамм *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 растворяли питательной средой Блаурокка (рН  $6.5 \pm 0.1$ ) и культивировали при температуре  $(38 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  в течение 96 часов путем двух последовательных пассажей по 48 часов культивирования каждый. Затем данную культуру в количестве 2.5% вносили в подготовленную для совместного глубинного культивирования модифицированную питательную среду КД-5 [Хижняк, 2014].

Леофилизированный штамм *Lactobacillus Plantarum* растворяли питательной средой МРС-1 (рН  $6.7 \pm 0.1$ ) и культивировали при температуре  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Затем проводили последовательные генерации на средах МРС-2 (рН  $7.3 \pm 0.1$ ) и МРС-4 (рН  $7.9 \pm 0.1$ ). Полученную маточную культуру вносили в подготовленную для совместного глубинного культивирования модифицированную питательную среду КД-5 в количестве 7.5% по объему.

Совместное культивирование бифидобактерий и лактобацилл проводили на модифицированной питательной среде КД-5 (рН  $7.0 \pm 0.1$ ) с включением лактитола в количестве 1%, в течение 24 ч при температуре  $(38 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ .

По окончании процесса накопления биомассы вносили защитную питательную среду, которая содержит сахарозу (18%), желатин (4.6%) и обрат. Леофильное высушивание проводили при соблюдении режима сверхмедленного замораживания для пробиотических препаратов (менее  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ), по методике [Бахтин и др., 2009].

Контроль количества жизнеспособных бактерий проводили методом разведений; контроль активности кислотообразования определяли потенциометрически; контроль образцов на микробиологическую чистоту и антагонистическую активность проводили по методике [Краснопольский, Борщевская, 2009]. Морфологию клеток изучали в мазках, окрашенных по Грамму.

В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие монопрепараты «Бифидумбактерин-Биофарма» и «Лактобактерин-Биофарма», представленные в продаже на фармацевтическом рынке Украины.

### Результаты и их обсуждение

Создание лечебно-профилактических препаратов, содержащих несколько пробиотических штаммов, которые находятся друг с другом в симбиотическом взаимодействии, является актуальной задачей современной биотехнологии. Терапевтическая, а следовательно, профилактическая и реабилитационная активность таких препаратов значительно повышается.

Бифидобактерии штамма *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 и лактобациллы штамма *Lactobacillus Plantarum* 8P-A3 выбраны нами не случайно.

Штамм *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 имеет противовирусные свойства, а экзаметаболиты этого штамма снижают антилизоцимную активность и способность к пленкообразованию бактерий и грибов рода *Candida* [Перунова, Иванова, 2009]. Этот штамм является факультативным аэробом, т.е. бактерии этого штамма могут жить и развиваться в присутствии кислорода, что упрощает технологию его культивирования. Также этот факт способствует максимально эффективному симбиозу с лактобациллами, которые поглощают кислород, растворенный в питательной среде. В свою очередь, бифидобактерии синтезируют свободные аминокислоты, необходимые для роста лактобацилл [Красникова, 1992].

Штамм *Lactobacillus Plantarum* 8P-A3 продуцирует ряд биологически активных веществ (молочная кислота, лизоцим, бактериоцины), имеет высокую антагонистическую активность в отношении широкого спектра аэробных и факультативно-анаэробных бактерий.

В технологическом процессе получения комплексного препарата мы впервые используем совместное глубинное культивирование штаммов бифидобактерий и лактобацилл. Соотношение посевного материала выбрано таким образом, чтобы основные ростовые показатели бактерий находились на максимально высоком уровне.

В качестве пребиотического компонента выбран лактитол, поскольку он имеет выраженные бифидо- и лактогенные свойства. Кроме того, экспериментально обосновано, что присутствие лактитола в составе питательной среды в малых количествах не уступает по своей эффективности наиболее распространенному пребиотику – лактулозе [Хижняк, 2014]. Важным превосходством является тот факт, что употребление лактитола пациентами, не воспринимающими лактозу и ее производные, является безопасным. Таким образом, на основе проведенных исследований нами получен лиофилизат бактерий, который содержит бифидобактерии штамма *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 в количестве  $10^8$  КОЕ/мл и лактобациллы штамма *Lactobacillus Plantarum* 8P-A3 в количестве  $10^9$  КОЕ/мл; пребиотический компонент лактитол – 1%.

Микробиологические исследования подтвердили сохранение всех основных индивидуальных особенностей морфологии бактерий. Активность кислотообразования бактерий находилась на высоком уровне, соответствовала установленным нормам и превышала показатели индивидуально выращенных штаммов (табл. 1).

Таблица 1  
Table. 1

**Активность кислотообразования штаммов**  
**The activity of acid production by strains**

Названия препаратов	Кислотообразование, °Т	
	На среде Блаурокка через 48 часов	На среде МРС-1 через 24 часа
Бифидумбактерин сухой	230±15	–
Лактобактерин сухой	–	220±12
Комбинированный препарат	392±20	290±21

Исследование антагонистической активности показало, что препарат имеет высокую активность по отношению к ряду патогенных штаммов (табл. 2).

Таблица 2  
Table. 2

**Антагонистическая активность препаратов (M±m)**  
**Antagonistic activity of preparation (M±m)**

Испыгуемые препараты	Зоны задержки роста тест-штаммов, мм						
	Sh. Flexneri 170	Sh. Sonnei 5063	Sh. Flexneri 337	E.coli 157	P. Vulgaris 170	P. Mirabilis	St. Aureus 209
Бифидумбактерин сухой	18.8±0.27	19.3±0.34	18.6±0.44	21.3±0.49	19.8±0.7	17.6±0.53	-
Лактобактерин сухой	25.3±0.41	20.8±0.28	22.7±0.42	23.8±0.49	21.6±0.27	20.6±0.37	21.8±0.29
Комбинированный препарат	27.4±0.32	22.5±0.18	23.8±0.45	23.9±0.35	22.4±0.37	21.9±0.43	22.1±0.31

Данные таблиц 1 и 2 свидетельствуют о симбиотическом типе взаимодействия бактерий в составе консорциума, что приводит к увеличению основных показателей роста и активности бактерий.

Следующим этапом являлась разработка лекарственной формы, которая бы способствовала максимальной защите бактерий от агрессивной среды желудка и способствовала продлению срока годности активной субстанции. Такой формой, по нашему мнению, является капсулирование.



Переход к выпуску капсулированных лекарственных форм взамен лиофилизатов во флаконах возможен при решении проблем, связанных с технологическими свойствами лиофилизированной бактериальной массы (низкая сыпучесть, высокая гигроскопичность). Следовательно, поиск и внедрение эффективных технологических приемов, направленных на улучшение свойств сухой биомассы бактерий, отвечающих потребностям развития производства пробиотических препаратов.

Для получения порошковых смесей с необходимыми технологическими параметрами требуется применение вспомогательных веществ, введение которых позволяет снизить гигроскопичность исходной биомассы, улучшить сыпучесть и оптимизировать насыпную плотность порошка для капсулирования. Важной характеристикой использованных нами вспомогательных веществ, ввиду особенностей действующего вещества, также является отсутствие отрицательного влияния на основные биологические функции бактериальной субстанции.

Поскольку основа капсул – пробиотические бактерии, наполнителем выбраны лактозы моногидрат марки mesh 200 и микрокристаллическая целлюлоза марки 101 – они имеют примерно равные размеры частиц и выполняют функцию дополнительных пребиотических компонентов в силу своих физико-химических характеристик [Перцев и др., 2010]. Учитывая высокую гигроскопичность лиофилизированной бактериальной субстанции, используем антифрикционное вещество – кремния диоксид (аэросил марки 200) [Перцев и др., 2010]. Нами экспериментально установлен факт отсутствия отрицательного влияния аэросила на ростовые показатели бактериальной культуры (табл. 3).

Таблица 3  
Table. 3

**Определение активности кислотообразования бактерий в образцах капсульных смесей**  
**Determination of the activity of acid bacteria in samples capsular mixtures**

Номера образцов	Наличие разрыхлителя	Количество разрыхлителя, %	Значения показателя активности кислотообразования, °Г
1	Кремния диоксид	9	335.0±15
2	Субстанция без разрыхлителя	-	360.0±20

Из таблицы видно, что применение в качестве разрыхлителя кремния диоксида не приводит к значительному снижению активности кислотообразования бактериальной культуры.

В результате проведенных экспериментов, нами установлен оптимальный состав фармацевтической композиции для производства лечебно-профилактического препарата в виде капсул с пробиотическими бактериями (табл. 4).

Таблица 4  
Table. 4

**Состав капсульной смеси**  
**The composition of the capsule mixture**

Состав на одну капсулу:	Масса компонентов, г	Состав капсулы, %
Бактериальная субстанция: штамм <i>B.bifidum</i> ЛВА-3 и штамм <i>L.plantarum</i> 8P-A3	0.513	65.0
Лактоза	0.111	14.0
МКЦ 101	0.119	12.0
Аэросил 200	0.07	9.0
Масса капсулы, г	0.79	100.0

Для капсульной массы выбраны твердые желатиновые капсулы № 00 с голубой непрозрачной крышечкой и синим непрозрачным корпусом. Масса содержимого одной капсулы 0.79±0.04.

Контроль образцов капсульной смеси подтвердил их соответствие установленным требованиям к препаратам-пробиотикам.

Физико-химические и технологические свойства капсульной массы находятся в соответствии с предъявляемыми требованиями (табл. 5).

Таблица 5  
Table. 5

**Физико-химические и технологические свойства капсульной массы**  
**The physico-chemical and technological properties of the capsule mixture**

Параметры	Единицы измерения	Значения для капсульной массы
Внешний вид		Масса светло-бежевого цвета
Насыпная плотность	г/мл	0.311±0.021
Плотность после усадки	г/мл	0.465±0.019
Текучесть	с/100 г образца	34.0±1.0
Угол природного откоса	Град	26.0±0.4

## Выводы

1. Нами установлен симбиотический тип взаимодействия штаммов пробиотических бактерий, входящих в состав препарата.
2. Экспериментальным путем установлено количественное соотношение бактерий и количество пребиотического компонента в препарате.
3. Доказано сохранение всех основных ростовых свойств бактерий в процессе совместного роста.
4. Предложена форма выпуска пробиотического препарата и разработан обоснованный состав.
5. Подтверждено соответствие разработанной лекарственной формы технологическим требованиям.

## Список литературы References

- Бахтин И.А. 2009. Универсальный режим сублимационного высушивания пробиотиков. Сибирский медицинский журнал, (4): 74–75.
- Bakhtin I.A. 2009. Universal'nyj rezhim sublimacionnogo vysushivaniya probiotikov [The universal mode of sublimation drying probiotics]. Siberian Medical Journal, (4): 74–75. (in Russian)
- Бондаренко В.М., Грачева Н.М. 2003. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов. Фарматека, (7): 56–63.
- Bondarenko V.M., Gracheva N.M. 2003. Preparaty probiotiki, prebiotiki i sinbiotiki v terapii i profilaktike kischechnyh disbakteriozov [Preparations probiotics, prebiotics and synbiotics in therapy and prevention of intestinal dysbiosis]. Farmateka, (7): 56–63. (in Russian)
- Красникова Л.В. 1992. Бифидобактерии и использование их в молочной промышленности. М.: АгроНИИТЭИММП, 32.
- Krasnikova L.V. 1992. Bifidobakterii i ispol'zovanie ih v molochnoj promyshlennosti [Bifidobacteria and their use in the dairy industry]. M.: AgroNIITEIMMP, 32. (in Russian)
- Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. 2009. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов. Харьков. НТУ «ХПИ», 352.
- Krasnopol'skiy Y.M., Borshchevskaya M.I. 2009. Farmaceuticheskaja biotehnologija. Tehnologija proizvodstva immunobiologicheskikh preparatov [The pharmaceutical biotechnology. Technology of production of immunobiological drugs]. Kharkov: NTU «KPI», 352. (in Russian)
- Лукьянова Е.М., Антипкин Ю.Г. 2009. Микробная экологическая система человека и использование отечественных мультипробиотиков для профилактики и устранения ее нарушений у детей. Современная педиатрия 4(26): 28–32
- Luk'yanova E.M., Antipkin Y.G. 2009. Mikrobnaja jekologicheskaja sistema cheloveka i ispol'zovanie otechestvennyh mul'tiprobiotikov dlja profilaktiki i ustraneniya ee narushenij u detej [The microbial ecological system of rights and the use of domestic multiprobiotics for the prevention and elimination of its disorders in children. Contemporary]. Pediatrics 4(26): 28–32. (in Russian)
- Перунова Н.Б. 2009. Влияние бифидобактерий на антилизосимную активность микроорганизмов и их способность к пленкообразованию. Журнал микробиологии, (4): 46–49.
- Perunova N.B. 2009. Vlijanie bifidobakterij na antilizoosimnuju aktivnost' mikroorganizmov i ih sposobnost' k plenkoobrazovaniju [The effect of Bifidobacterium antilysozyme activity on microorganisms and their film formation ability]. Microbiology, (4): 46–49. (in Russian)
- Перцев И.М. 2010. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність. Х.: Золоті сторінки, 600.
- Pertsev Y.M. 2010. Dopomizhni rehovini v tehnologii likiv: vpliv na tehnologichni, spozhivchi, ekonomichni harakteristiki i terapevtichnu effektivnist' [Excipients in drug technology: impact on technology, consumer, economic characteristics and therapeutic effectiveness]. H.: Zoloti Storinku, 600. (in Ukrainian)
- Хижняк О.С. 2014. Визначення пробіотичних властивостей замітника цукру лактитолу в умовах in vitro. Вісник НТУ «ХПІ». Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. Х.: НТУ «ХПІ». № 26 (1069): 140–148.
- Khyzhnyak O.S. 2014. Vznachennja probiotichnih vlastivostej zaminnika cukru laktitolu v umovah in vitro [Determination of probiotic properties of sweeteners laktitol in conditions in vitro]. Vestnik NTU «KPI». Series: New solutions in modern technology. H.: NTU «KPI». № 26 (1069): 140–148. (in Ukrainian)
- McCartney AL, Wenzhi W, and Tannock GW. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62: 4608–4613.