

ГБОУ ВПО «ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ
АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВО И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Федорова Татьяна Викторовна

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ ПОЛИКОМПОНЕНТНОГО
ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИТОВ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ
ШТАММОВ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
В.А. Несчисляев,
Научный консультант:
доктор биологических наук
А.М. Николаева

Пермь – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА И АРСЕНАЛ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ ЧЕЛОВЕКА.....	10
1.1. Нормальная микрофлора человека	10
1.1.1 Состав нормофлоры	10
1.1.2 Функции нормофлоры	11
1.2 Характеристика лактобактерий и бифидобактерий.....	15
1.3 Лекарственные средства и биологически активные добавки к пище на основе пробиотических штаммов бактерий и их метаболитов.....	23
1.3.1 Ассортимент пробиотиков.....	24
1.3.2 Технологические приемы получения бесклеточных пробиотиков	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1. Микроорганизмы.....	30
2.2. Препараты	31
2.3 Питательные среды	31
2.4. Материалы для получения комплексного метабиотика	32
2.5. Физико-химические методы.....	32
2.6. Технологические методы.....	35
2.7. Микробиологические методы	36
2.8. Статистические методы анализа.....	40
ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ	41
3.1 Получение бактериальных взвесей	42
3.2. Выбор марки ультрафильтрационного волокна для получения экзометаболитных комплексов.....	45
3.3. Получение, физико-химическая и биологическая характеристика ультрафильтратов культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий.....	46

ГЛАВА 4. ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА И ФОРМЫ ВЫПУСКА МЕТАБОЛИТНОГО МОНОПРЕПАРАТА «МИКРОСТИМ».....	60
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО МЕТАБИОТИКА «ХИЛАБИКС» ..	73
5.1 Физико-химические показатели и биологическая активность комплексного метабиотика	74
5.2 Технология получения комплексного метаболитного пробиотика «Хилабикс»	79
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	95
СОКРАЩЕНИЯ	110
ПРИЛОЖЕНИЯ	112
ПРИЛОЖЕНИЕ А (обязательное) Проекты нормативной документации	113
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (обязательное) Ультрафиолетовые спектры культуральных жидкостей пробиотических штаммов	117
ПРИЛОЖЕНИЕ В (обязательное) Хроматограммы ультрафильтратов культуральных жидкостей пробиотических штаммов	121
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (обязательное) Ультрафиолетовые спектры и хроматограммы «Хилабикс 15» и «Хилабикс 100»	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) играет значительную роль в процессе жизнедеятельности человека. Находясь с макроорганизмом во взаимосвязи, она выполняет ряд присущих ей физиологических функций: антагонистическую, дезинтоксикационную, пищеварительную, витаминообразующую, иммуностимулирующую и другие [40, 19, 93].

Состав нормальной микрофлоры ЖКТ может существенно изменяться под воздействием многочисленных неблагоприятных факторов различной природы, включая антибиотикотерапию. Бесконтрольное массовое использование антибактериальных препаратов широкого спектра действия вызывает различные осложнения, в частности, развитие дисбиозов [8, 11, 36, 59, 63]. При этом широкое распространение штаммов патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, привело к резкому снижению эффективности терапии инфекционных заболеваний.

В практической микробиологии особую актуальность приобретают исследования в сфере разработки нового поколения лекарственных средств, предназначенных для поддержания и восстановления симбиотических микробиоценозов [3], в том числе внедрение в медицинскую практику принципиально новых пробиотиков-метабиотиков, создаваемых на основе микробных экзометаболитов. Метаболитные субстанции реализуют свое положительное влияние через поддержание состояния эубиоза в макроорганизме путем угнетения роста условно-патогенных экзогенных и эндогенных микроорганизмов и стимуляции роста представителей нормофлоры, участвуют в обмене веществ, поддержании водно-электролитного баланса в кишечнике, являются источником питания для кишечного эпителия, оказывают антиканцерогенное и антимуtagenное действие, регулируют деятельность иммунной системы макроорганизма и т.д. [107, 117, 131]. Препараты, содержащие

метаболиты лакто- и бифидобактерий, могут быть рекомендованы для лечения и профилактики кишечных инфекций, для профилактики дисбиозов при приеме антибактериальных препаратов (одновременно с курсом антибиотиков) в комплексной терапии гастритов, колитов, диспепсии, синдрома недостаточности пищеварения, заболеваний желчного пузыря и печени, аллергических заболеваний, иммунодефицитов различной этиологии [15, 18, 48, 106,]. К преимуществам метаболитных пробиотиков следует отнести отсутствие потенциальной возможности угнетения индигенной микрофлоры, что не исключено при приеме традиционных препаратов, содержащих живые бактерии. Так «Хилак форте» - импортный представитель этой новой группы пробиотических препаратов - имеет широкий перечень показаний к применению, включающий: нарушения физиологической флоры тонкого и толстого кишечника во время и после лечения антибиотиками или лучевой терапии; гастроэнтерит, колит; энтерогенные заболевания желчного пузыря и печени; кожные болезни аллергического генеза и др. [48].

В связи с вышеизложенным представляется актуальной разработка пробиотического препарата на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий, положительно зарекомендовавших себя в терапевтической практике при коррекции дисбиотических нарушений.

Степень разработанности темы диссертации.

Проблеме создания метаболитных пробиотиков посвящены работы отечественных авторов, включая Несчисляева В.А., Вахитова Т.Я., Молохову Е.И. и др. Исследования Несчисляева В.А. с соавторами по разработке метаболитного монопробиотика на основе экзометаболитов лактобактерий в значительной мере способствовали созданию комплексного препарата на основе метаболитов нескольких бактериальных штаммов.

Цель настоящего исследования-разработка состава и технологии комплексного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий.

Задачи исследования:

1. Отработать оптимальные параметры ультрафильтрационного выделения метаболитных комплексов из культуральной жидкости производственных штаммов пробиотических бактерий.
2. Исследовать физико-химические свойства и биологическую активность полученных экзометаболитных комплексов лакто- и бифидобактерий.
3. Оптимизировать состав и лекарственную форму метаболитного монопробиотика «Микростим».
4. Экспериментально обосновать состав и разработать технологию получения комплексного метабиотика.

Методология и методы исследования. Методологическую основу исследования составили труды как отечественных, так и зарубежных учёных по разработке принципиально новых пробиотиков (метабиотиков), создаваемых на основе микробных экзометаболитов пробиотических бактерий. Наряду с библиографическим, в работе были использованы аналитические и статистические методы исследования. В зависимости от поставленной цели и задач данные методы использовались на разных этапах исследования.

Научная новизна работы

Впервые предложен и реализован комплексный методологический подход к созданию поликомпонентных метаболитных пробиотиков, включающий совокупность микробиологических и технологических приемов конструирования, изготовления и стандартизации.

Выявлено выраженное бактериотропное действие метаболитных комплексов, характеризующееся наличием эффекта стимуляции роста и активности кислотообразования пробиотических бактерий и угнетающим влиянием на условно-патогенные микроорганизмы.

Разработан состав и технология получения отечественного поликомпонентного пробиотика на основе метаболитов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Lactobacillus acidophilus* К₃Ш₂₄ и *Bifidobacterium bifidum* 1, обладающего более высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных

бактерий по сравнению с импортным аналогом «Хилак форте».

Предложен инновационный метод исследования влияния вспомогательных веществ на представителей индигенной и условно-патогенной микрофлоры макроорганизма, заключающийся в измерении угнетения биолюминесценции тест-штамма *E. coli lum+*.

Практическая и теоретическая значимость работы заключается в расширении арсенала лекарственных средств, предназначенных для коррекции дисбиотических состояний, и технологических новациях в сфере производства пробиотиков. Разработана комплексная технологическая схема, сочетающая выделение с помощью ультрафильтрации из культуральной жидкости лакто- и бифидобактерий метаболитных фракций с одновременным получением клеточных концентратов, предназначенных, соответственно, для изготовления метабиотиков и традиционных бактериальных пробиотиков, что значительно удешевляет производимые препараты. Указанная схема включена в проект нормативной документации получения моно- и поликомпонентных пробиотиков метаболитного типа.

Оптимизирован состав и лекарственная форма метаболитного монопробиотика «Микростим». В состав препарата введены вспомогательные вещества, которые значительно улучшили органолептические показатели пробиотика при сохранении его биологической активности и стабильности.

Определены необходимые параметры специфической активности разработанных метабиотиков и предложены методы их контроля.

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 метаболитных пробиотиков.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения метаболитных комплексов лакто- и бифидобактерий для конструирования пробиотических препаратов.

2. Характеристика бактериотропных свойств метаболитных комплексов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий.

3. Выбор вспомогательных веществ для коррекции органолептических свойств пробиотика, содержащего метаболитный комплекс *L. plantarum* 8P-A3 («Микростим»).

4. Состав, технология и биологические свойства комплексного метаболитного пробиотика «Хилабикс».

Связь задач исследования с проблемным планом научно-исследовательских работ

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профильного образования «Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации» (№ 01.9.50007417).

Степень личного участия

Данные, приведенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора на всех этапах планирования и проведения экспериментальных исследований на базе ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России и в филиале ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России "Пермское НПО "Биомед", статистической обработки полученных результатов.

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения и выводы базируются на большом объеме проведенных исследований, выполненных с использованием современных методов анализа и последующей статистической обработкой результатов исследования.

Основные результаты работы доложены на Всероссийской конференции «Биомедицинская инженерия и биотехнология» (Курск, март 2011); XVIII Российском Национальном Конгрессе "Человек и Лекарство" (Москва, апрель

2011); 13 Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2011» (Санкт-Петербург, май 2011); I Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых учёных «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Пермь, ноябрь 2011); X Съезд эпидемиологов, микробиологов паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения российской Федерации» (Москва, апрель 2012); межвузовской научной конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА (Пермь, апрель 2012); 14-го Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2012» (Санкт-Петербург, май 2012), 15-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2013» (Санкт-Петербург, май 2013), 16-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2014» (Санкт-Петербург, май 2014), 17-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2015» (Санкт-Петербург, май 2015).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 4 паспорта специальности – технология получения лекарств.

Публикации. По материалам исследования опубликовано 15 работ (из них 5 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ).

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 таблицами и 30 рисунками (из них 22 в приложении), состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав экспериментальных исследований, выводов, списка литературы, включающего 140 источников, из них 109 отечественных и 31 иностранных авторов, приложений на 15 с.

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА И АРСЕНАЛ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ ЧЕЛОВЕКА

1.1. Нормальная микрофлора человека

1.1.1 Состав нормофлоры

Нормальная микрофлора человека представляет собой совокупность разнообразных популяций микробов отдельных органов и систем, поддерживающую биохимическое, метаболическое и иммунологическое равновесие, необходимое для сохранения здоровья макроорганизма.

Человек и его микрофлора находятся в состоянии динамического равновесия. Взаимодействия между макроорганизмом и заселяющими его микробными ассоциациями носят характер симбиоза. Благодаря наличию сложной и разветвленной системы кооперации между населяющими макроорганизм популяциями, микроэкологическая система человека выступает как единое целое, согласованно работающее в интересах всей системы и организма хозяина, в котором она локализована [91, 49, 62, 102].

Значительная часть (более 60%) микрофлоры заселяет различные отделы желудочно-кишечного тракта. Примерно 15-16% микроорганизмов приходится на ротоглотку. Урогенитальный тракт, исключая вагинальный отдел (9%), заселен довольно слабо (2%); остальная часть приходится на кожные покровы (12%). Максимальное количество бактерий присутствует в толстом кишечнике, где оно составляет более 400 млрд микробных клеток на 1 г содержимого [5, 69, 38].

Нормофлора ЖКТ представлена сложным составом микроорганизмов, которые локализованы в пристеночном слое или в просвете органа. Формирование просветного микробиоценоза зависит от многих экзогенных и эндогенных факторов, а его окончательный состав является результатом смешивания транзитных и индигенных микроорганизмов. Наибольшее количество микробов

составляет пристеночную микрофлору, содержащуюся в муциновом слое [25].

Известно, что бифидобактерии и лактобациллы относятся к основной части облигатной (индигенной) микрофлоры человека. Это анаэробные бактерии, морфологически представляющие собой крупные грамположительные неспорообразующие палочки. В ЖКТ эти микроорганизмы аналогично многочисленным представителям индигенной микрофлоры распределяются как горизонтально – от просвета кишечной стенки до различных слоев слизистой оболочки, так и вертикально – от ротовой полости до дистальных отделов толстой кишки. Большая часть указанных бактерий располагается в толстой кишке, присутствуя в кишечнике на протяжении всей жизни человека. В состав индигенной микрофлоры ЖКТ входят также бактериоиды, зубактерии, кишечные палочки, энтерококки, клостридии, сапрофитные стрептококки и стафилококки и многие другие виды факультативных и резидентных микробов [47, 57].

Индигенный состав микрофлоры заложен генетически. К факультативным микробам относится большинство условно-патогенных видов, количество которых в норме ограничено [5]. В составе нормобиоценоза выделяют следующие группы микроорганизмов:

- главную (более 90% всех микробов) – в том числе бифидобактерии и бактериоиды;
- сопутствующую (около 10% от общего числа микробов) - лактобактерии, кишечная палочка, энтерококки и др.;
- остаточную (менее 1% от общего числа микробов) - протей, энтеробактер, клостридии, стафилококки и др. [5].

1.1.2 Функции нормофлоры

Нормальная микрофлора кишечника выполняет и регулирует многие процессы в организме человека [91, 26, 42]. Одной из важнейших функций нормофлоры является обеспечение колонизационной резистентности (впервые

термин был введен в научную литературу D. Van der Waaij в 1971 г.), под которой понимают совокупность механизмов, придающих стабильность индигенной микрофлоре и предотвращающих заселение макроорганизма посторонними микробами [29]. Колонизационная резистентность обусловлена целым рядом факторов, среди которых:

- эффект «экранирования» слизистой от проникновения условно-патогенных микроорганизмов за счет высокой адгезивной активности индигенных бактерий;

- выработка нормальной микрофлорой комплекса веществ, оказывающих антагонистическое действие [13, 89, 81, 135];

- стимуляция местного иммунитета, активация синтеза секреторного IgA, который препятствует адгезии условно-патогенных микроорганизмов к эпителиальным клеткам [14, 39, 59, 64, 65];

- конкуренция с экзогенными микробами за питательные субстраты [85, 98, 105].

Кишечная цитопротекция включает преэпителиальный, эпителиальный и постэпителиальный защитный слизистый барьер. Основными компонентами преэпителиального защитного барьера являются слизь; иммуноглобулины A1 и A2, связанные с гликопротеинами слизи; гликокаликс с его нормальными реологическими параметрами, обеспечивающими резистентность эпителия к бактериальным и химическим агентам; ряд низкомолекулярных кишечных метаболитов, обеспечивающих колонизационную резистентность слизистой оболочки в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [2]. Эпителиальный (внутренний) защитный барьер включает апикальные клеточные мембраны и тесные межклеточные соединения, блокирующие пассаж в клетку макромолекул и препятствующие их межклеточному проникновению. В состав постэпителиального барьера входит кровоток, обеспечивающий фагоцитоз, гуморальные иммунные реакции и другие механизмы защиты. Большую защитную роль выполняет кишечная лимфатическая система, включающая внутриэпителиальные Т-лимфоциты, Пейеровы бляшки и собственную пластинку

слизистой оболочки кишки, а также ряд регуляторных субстанций (простагландины, энкефалины, факторы роста, секретин, сульфидрилы и др.), которые усиливают защитные функции слизистого барьера [31, 108].

Микроорганизмы нормофлоры принимают активное участие в процессах переваривания и всасывания пищи [4]. При участии бактериальной флоры кишечника формируется три потока веществ, направленные из ЖКТ во внутреннюю среду организма. Один из них – поток нутриентов, модифицированных микрофлорой (например, амины, возникающие при декарбоксилировании аминокислот), второй – поток продуктов жизнедеятельности самих бактерий и третий – поток модифицированных бактериальной флорой балластных веществ. При участии микрофлоры образуются вторичные нутриенты, в том числе моносахариды, летучие жирные кислоты, витамины, простагландины [5, 104].

Процессы детоксикации различных веществ и субстанций протекают с вовлечением нормальной микрофлоры в условиях анаэробноза за счёт гидролитических и восстановительных реакций. Процесс детоксикации в этом случае идёт по нескольким направлениям:

- биотрансформации с образованием конечных нетоксичных продуктов;
- микробной трансформации, сопровождающейся образованием метаболитов, подвергающихся быстрой деструкции в печени;
- изменению полярности соединений, приводящие к изменению скорости их экскреции в окружающую среду или транслокации из крови в просвет кишечника и мочевыделительную систему [80].

Нормофлора способствует нормальной перистальтике кишечника. Доказано, что некоторые продукты жизнедеятельности микроорганизмов являются важнейшим и предпочтительным источником энергии для эпителия пищеварительного тракта [102]. Кроме того, выработка летучих жирных кислот, таких как молочная, уксусная, пропионовая, масляная способствуют: регуляции состава микрофлоры, поддержанию водно-электролитного баланса в просвете кишки, энергообмену, питанию и росту кишечного эпителия [10, 122].

Представители грамположительной микрофлоры человека в процессе своей жизнедеятельности образуют значительные количества внеклеточных веществ различной химической природы, молекулярного веса и физиологической активности. Экзометаболиты способны оказывать выраженное иммуностимулирующее действие на организм человека и животных; проявлять противоопухолевый и гипохолестеринэмический эффект; сорбировать различные токсические соединения [17, 26, 32, 84].

Нормальная микрофлора играет важную роль в формировании иммунокомпетентных органов и тканей макроорганизма. Доказано, что у безмикробных особей в сравнении с конвенциональными мышами значительно снижен уровень IgG, отсутствуют в кишечнике плазматические клетки, продуцирующие IgA [87, 138].

Нормальную микрофлору с входящими в нее многочисленными и разнообразными микроорганизмами можно рассматривать как первичную мишень приложения любого соединения, попадающего обычным (непарентеральным) путем, как структуру, первой вовлекаемую в процессы распознавания, метаболизма, абсорбции и транслокации как полезных, так и потенциально вредных агентов. Нормальная микрофлора представляет собой первичный неспецифический барьер, после прорыва которого инициируется включение всех последующих неспецифических и специфических механизмов защиты макроорганизма [1, 42, 102].

Таким образом, нормофлора макроорганизма обеспечивает колонизационную резистентность, играет важную роль в пищеварении, обмене веществ и функционировании иммунной системы, что подчеркивает её значимость для организма человека и необходимость коррекции микробиоценозов при дисбиотических состояниях.

1.2 Характеристика лактобактерий и бифидобактерий

По общепринятым представлениям значимую роль в поддержании нормального физиологического состояния микрофлоры ЖКТ играют анаэробные бактерии семейств *Lactobacillus* и *Bifidobacteria*, не обладающие патогенными свойствами.

Бифидобактерии — это анаэробные бактерии, морфологически представляющие собой чрезвычайно вариабельные по форме грамположительные неспорообразующие палочки, несколько изогнутые, булабовидные и часто разветвленные [94].

Большая часть бифидобактерий обитает в толстой кишке, являясь ее основной пристеночной и просветной микрофлорой.

Бифидобактерии занимают доминирующее положение в микробном пейзаже кишечника у здоровых новорожденных детей, находящихся на естественном вскармливании, к 5-20 дню после рождения. В норме количество бифидобактерий у грудных детей составляет 10^{10} - 10^{11} КОЕ/г фекалий, у детей старшего возраста и у взрослых - 10^9 - 10^{10} КОЕ/г.

На первом году жизни человека преобладают бифидобактерии, отличающиеся низкой ферментативной активностью в отношении углеводов (как правило, они в состоянии утилизировать только простые сахара или лактозу) - *B. bifidum*, *B. parvulorum*, *B. breve*, *B. lactentis*. С возрастом, когда в рацион человека, кроме молока, вводятся другие продукты питания, бифидофлора обогащается микроорганизмами, способными утилизировать большой спектр сахаров и, таким образом, размножаться даже в условиях безмолочного рациона - *B. adolescentis*, *B. longum*. Таким образом, спектр бифидобактерий у взрослого человека представлен видами - *B. adolescentis*, *B. longum* и *B. bifidum*.

Бифидобактерии синтезируют аминокислоты, белки, витамины группы В, биотин, никотиновую и фолиевую кислоты, вещества с антиоксидантной активностью [16, 20, 24, 54].

Лактобактерии – молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*; насчитывают около 50 видов, грамположительные палочки различной длины (0,5-1,2x1,0-10 мкм) с закруглёнными концами, часто собирающиеся в короткие цепочки. Спор не образуют. Факультативные анаэробы, микроаэрофилы, реже облигатные анаэробы [95].

На слизистых оболочках в организме человека обнаруживают, как правило, 7 видов лактобактерий: *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* и *L. buchneri*.

Важной характеристикой этих микроорганизмов служит сахаролитический тип метаболизма. В процессе сбраживания углеводов под действием ферментов лактобацилл и бифидобактерий образуются короткоцепочечные жирные кислоты – молочная, уксусная, масляная, пропионовая, в присутствии которых тормозится развитие условно-патогенных штаммов, обладающих в большинстве своем протеолитическим типом метаболизма [39]. Ингибирование протеолитических штаммов сопровождается угнетением гнилостных процессов и подавлением образования аммиака, ароматических аминов, сульфидов, эндогенных канцерогенов. Благодаря выработке жирных кислот происходит регуляция рН внутрикишечного содержимого [91, 121]. Показано, что выраженное угнетение роста, размножения и процесса адгезии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов зависит от совместного присутствия всего спектра кислот, вырабатываемых нормофлорой желудочно-кишечного тракта. Синергизм такого сочетания обеспечивает ингибирование не только бактерий, но и некоторых видов дрожжей, при этом практически не затрагивается кислотоустойчивая нормальная микрофлора.

Антимикробный эффект молочной и уксусной кислот хорошо изучен. Они обеспечивают поддержание показателя рН внутрикишечного содержимого на уровне 4,0–5,8, благодаря чему сдерживается рост и размножение условно-патогенных и гнилостных микроорганизмов в кишечнике [6, 36, 109], а также проникают через мембрану, выделяют ион гидроокиси в нейтральную цитоплазму, что приводит к подавлению жизненных функций клетки. Так, уксусная кислота при

pH выше 4,5 проявляет более выраженный ингибирующий эффект, чем молочная кислота, и, наоборот, при pH ниже 4,0 более сильная антимикробная активность наблюдается у молочной кислоты [80, 86, 82].

Молочная и уксусная кислота относятся к летучим жирным кислотам (ЛЖК) – это монокарбоновые кислоты с длиной цепи до 8 атомов углерода, поэтому в англоязычной литературе их еще называют "short chain fatty acids" (SCFA) - короткоцепочечными жирными кислотами. К ним относятся также пропионовая, изомасляная, масляная, изовалериановая, валериановая, изокапроновая и капроновая кислоты. Они являются основным продуктом микробной ферментации углеводов, жиров и белков в кишечнике макроорганизма. ЛЖК выполняют важные функции в макроорганизме, обеспечивая тем самым его гомеостаз:

1. Регулируют состав микрофлоры; их антибактериальная активность препятствует колонизации слизистых патогенными микроорганизмами [83].

2. Поддерживают водно-электролитный баланс в просвете кишки. Вместе с ЛЖК всасываются ионы натрия, калия, хлора и воды. От всасывания ЛЖК зависит содержание карбонатов в просвете кишечника и pH кишечного содержимого.

3. Поддержание энергообмена. ЛЖК участвуют в расщеплении растительной клетчатки с высвобождением углеводов [116, 123, 132].

4. Питание и рост кишечного эпителия. Масляная кислота является источником питания колоноцитов, обеспечивая их энергией почти на 70%.

ЛЖК обладают антиканцерогенным действием. Это достигается за счет выработки масляной кислоты, которая действует на многие клеточные регуляторы, участвующие в дифференцировке эпителия толстого кишечника. Многочисленные исследования показали защитную роль масляной кислоты в отношении появления и роста раковой опухоли толстого кишечника. Возможно, в этом заключается антиканцерогенное действие диеты, богатой растительной клетчаткой [10].

Особое место среди антибактериальных метаболитов лактобактерий занимает перекись водорода, она угнетает рост целого ряда микроорганизмов – кишечной палочки, стафилококков, псевдомонад, гонококков и др.

Штаммы *L. fermentum*, *L. casei* и *L. acidophilus*, составляющие нормальную

микрофлору кишечника и влагалища человека, активно продуцируют лизоцим [74, 105].

Наиболее значимыми для реализации антагонистической активности лактобактерий считаются бактериоцины и бактериоциноподобные вещества [7, 2, 25, 136, 139, 128, 134].

Бактериоциногенез — биологический феномен, широко распространенный в природе и связанный с антагонизмом у бактерий. Бактерии семейства *Lactobacillus* и *Bifidobacteria* синтезируют антибиотические вещества пептидной природы, убивающие родственные виды или штаммы тормозящие их рост, или имеющие более широкий спектр антибактериального действия [75]. Эти вещества с весьма специфическим действием получили название бактериоцинов, биосинтез которых кодируется особыми плазмидами и происходит в большинстве случаев на рибосомах. Бактериоцины — это наиболее высокомолекулярные антибиотики [7, 12, 13, 35, 90].

Известны два типа бактериоцинов: первый тип - высокомолекулярные, подавляющие в основном близкородственные виды бактерий, обитающих в той же экологической нише, и второй тип - низкомолекулярные вещества — микроцины, характеризующиеся широким спектром антагонистической активности [28, 30, 114, 115].

В отличие от известных антибиотиков бактериоцины имеют сравнительно узкий спектр действия, т.к. активны против бактерий того же или филогенетически родственных видов. Особенно это характерно для веществ, выделенных из грамотрицательных бактерий. Для бактериоцинов грамположительных бактерий характерен более широкий спектр действия [35, 119].

Молекулярная масса бактериоцинов грамположительных бактерий колеблется от 10 до 5000 кДа [134]. Величина молекулярной массы влияет на термостабильность, антигенность и другие свойства бактериоцинов.

Молочнокислые бактерии продуцируют широкий спектр бактериоцинов: курвацин, диацетин, лактококцин, ацидоцин, лактоцин, плантацин и др. Бактериоцины из молочнокислых бактерий первого типа, вызывающие гибель

организмов, близких к организму-продуценту, включают: амиловорин, курвацин А. Бактериоцины, относящиеся ко второму типу, ингибируют рост многих видов грамположительных микроорганизмов, в том числе *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis*. К бактериоцинам относятся: ацидоцин В, курвацин FS47, плантарицин С, саркацин 674. Показано, что большая часть этих бактериоцинов не токсична и не иммуногенна [35].

Из молочнокислых бактерий выделено несколько бактериоцинов, которые являются лантибиотиками. Лантибиотики — это бактериальные полипептиды, в состав которых входят такие редкие тиоэфирные аминокислоты, как лантионин и метиллантионин [120]. Эти вещества имеют широкий антимикробный спектр действия. По механизму биосинтеза лантибиотики можно разделить на две группы: низины и субтилин, продуцируемый *B. subtilis*, которые синтезируются на рибосомах, и лантибиотики, биосинтез которых происходит не на рибосомах [124]. Механизм биологического действия лантибиотиков, в том числе низина, связан с нарушением проницаемости бактериальных цитоплазматических мембран [125, 110]. Нарушение мембранного потенциала инициируется образованием пор, через которые проходят молекулы лантибиотиков. К лантибиотикам, образуемым молочнокислыми бактериями, относятся: лактицин 481, стрептококцин AFF22, саливаримицин А, вариацин, лактицин 3147 [120].

Лактицин 3147, образуемый *L. lactis* 3147, имеет широкий антимикробный спектр действия (сходный с низином), термостабилен. Низин - один из наиболее изученных бактериоцинов, его называют также полипептидным антибиотиком, он относится к группе лантибиотиков и образуется определенными штаммами *L. lactis* [137]. Это мембранотропный полипептид, подавляющий рост бактерий путем нарушения образования мембранного потенциала. Изучение механизма действия низина привело к выводу, что мишенью для его действия служит именно цитоплазматическая мембрана. Из культуральной жидкости *L. lactis* 10-1 выделили и очистили до гомогенного состояния пептидный антибиотик (или бактериоцин). Его идентифицировали как производное низина А - низин Z. Он подавляет рост

различных грамположительных бактерий, но не штамма продуцента низина А, обладает М.м. 3337,9 Да, его структура отличается от таковой низина А одной аминокислотной заменой (гистидин-27 на аспарагин-27). Вещество является лантибиотиком.

Бифидобактерии также способны продуцировать антибиотикоподобные субстанции. Эти соединения – бифидин и бифилонг, достаточно стабильны при температуре 100 °С, активны при кислой рН и проявляют антимикробную активность в отношении многих видов энтеробактерий, вибрионов, стрептококков и стафилококков [80].

Еще в 1966 г. Д.Г. Кудлай и В.Г. Лиходед писали о том, что специфичность действия бактериоцинов определяется их природой и наличием рецепторов на поверхности чувствительных бактерий, на которых адсорбируются бактериоцины. Штаммы бактерий, утратившие способность синтезировать рецепторы, становятся резистентными к бактериоцинам.

Бактериоцины неоднородны по механизму действия. Предполагают, что механизм биологического действия ряда бактериоцинов связан с нарушением проницаемости цитоплазматических мембран. Ряд авторов считает, что механизм действия бактериоцинов из лактококков — это образование пор в цитоплазматической мембране чувствительных клеток. *Lactococcus lactis* образует два класса бактериоцинов: лантибиотики (низин и др.), пептиды, содержащие необычные аминокислоты (лантионин и др.), и класс термоустойчивых коротких полипептидов, не содержащие лантионина. Разница в механизме действия этих двух классов лактококковых бактериоцинов заключается в том, что механизм действия низина не предполагает рецептора, низин встраивается во внутреннюю мембрану, образуя ионные каналы или поры. Нелантибиотические бактериоцины — диплококцин, лактострепцин и лактококцины — образуют поры, взаимодействующие со специфическим рецептором [138].

Механизм действия лактококцина G, выделенного из *L. lactis*, связан с тем, что этот бактериоцин нарушает проницаемость бактериальных цитоплазматических мембран. Этот пептид является порообразующим токсином,

который создает каналы в цитоплазматической мембране.

Плантарицин А из *L. plantarum* состоит из двух пептидов *a* и *b*, для проявления активности требуется действие обоих пептидов. Изучена их структура, определена молекулярная масса. Исходя из структуры, пептиды данного бактериоцина отнесены к пороформирующим пептидам, которые создают каналы в клеточной мембране [130, 136, 139]. Процесс синтеза бактериоцинов лактобактериями является индуцибельным. Проведенные исследования показали, что химически синтезированный или очищенный бактериальный плантарицин, при добавлении к непродуцирующей культуре лактобактерий, стимулирует синтез плантарицина данной культурой. Установлено, что плантарицин способен стимулировать свой собственный синтез транскрипцией оперона *plnABCD* [68, 112].

Способность бактерий продуцировать бактериоцины определяется наличием в клетке бактериоциногенных факторов, определенных генетических детерминант. Еще в 70-х годах XX века высказывалось мнение, что способность продуцировать, например, колицины определяется наличием у бактерий-продуцентов специфических генетических детерминант, т.н. колициногенных факторов, которыми, очевидно, являются эписомы. Способность продуцировать бактериоцин и устойчивость к гомологичному бактериоцину (иммунитет) - это основные признаки, отличающие бактериоциногенные микроорганизмы от небактериоциногенных [60].

До недавнего времени ничего не было известно об иммунных системах защиты собственных продуцентов от бактериоцинов. Как отмечается Saris et al., образование бактериоцинов является типичной двойной экспрессией иммунных белков, защищающих штаммы продуцентов от летального действия собственных продуктов [6].

Бактериоцины и подобные им субстанции водорастворимы, не имеют вкуса и запаха, неканцерогенны, неаллергенны и активны в малых концентрациях [67]. В настоящее время проводится большое количество исследований с целью замены химических пищевых консервантов на безопасные биологические антимикробные

добавки - бактериоцины [113]. Однако, практическое использование их ограничено по ряду причин, среди которых – синтез антибактериального вещества при совместном культивировании с другими микроорганизмами. Примером может служить реутерин, который вырабатывается культурой *L. reuteri* в присутствии комплекса бактерий, в том числе кишечной палочки [118]. Другая причина – сложность выделения и очистки антибактериальных пептидов и, как следствие этого, высокая себестоимость конечного продукта. Кроме того, такие биологические консерванты взаимодействуют с компонентами пищевого продукта, что ведет к изменению его органолептических свойств и инактивации самого бактериоцина.

При рассмотрении экологической роли бактериоцинов отмечено, что они играют большую роль в природных бактериальных сообществах. Синтез этих веществ имеет значение для конкуренции внутри популяции и между ними. Результат эволюции бактериоцинов — разнообразие структур этих веществ рассматривается как эволюционная дивергенция, связанная с разнообразием конкурирующих между собой видов [114].

В естественных условиях бактериоциногенения может быть одним из факторов, влияющих на формирование микробного ценоза. Поэтому большой интерес представляет выяснение значения этого явления для развития популяции. У бактериоциногенных популяций суммарная защитная активность проявляется в подавлении развития других бактерий, обладающих сходными пищевыми потребностями (родственные виды микроорганизмов). Это подавление обеспечивается бактериоцином, который продуцируют отдельные клетки этой популяции. Эти клетки погибают, но остальные клетки популяции не чувствительны к бактериоцину, который вытесняет другие микроорганизмы, чувствительные к данному веществу. Бактериоциногенные бактерии обладают важным селективным преимуществом в условиях микробных ассоциаций, естественно складывающихся в процессе эволюции [19].

Представленные в данном разделе материалы свидетельствуют о наличии в культуральной жидкости лакто – и бифидобактерий целого комплекса метаболитов,

обладающих антибактериальным действием в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Вышеуказанное свидетельствует о возможности использования бактериальных метаболитов в качестве лекарственных средств и натуральных консервантов.

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о большой значимости пробиотических бактерий для макроорганизма. Метаболиты, продуцируемые ими, оказывают стимулирующее действие на индигенную микрофлору макроорганизма, проявляют противомикробное действие по отношению к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры, а также иммуностропное действие.

1.3 Лекарственные средства и биологически активные добавки к пище на основе пробиотических штаммов бактерий и их метаболитов

Идея использования полезных для человека живых микроорганизмов для восстановления нормального функционирования ЖКТ принадлежит И.И. Мечникову. В 1903 г. он сформулировал положение о наличии зависимости между продолжительностью жизни и состоянием аутофлоры организма человека, а в 1907 году предложил употреблять в питание большие количества живых молочнокислых бактерий (*Lactobacillus bulgaricus*) в виде йогурта, кефира – что в дальнейшем привело к развитию научного направления, связанного с созданием биологических препаратов из живых бактерий – представителей нормальной микрофлоры человека [140].

Вековой положительный опыт применения препаратов для коррекции дисбиотических нарушений на основе полезных культур микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры кишечника (пробиотиков) не вызывает никаких сомнений. Отличительная черта от антибиотиков заключается в том, что действие пробиотиков направлено на восстановление микробиоценоза кишечника, а не на уничтожение части популяции кишечного сообщества [5, 127, 25].

1.3.1 Ассортимент пробиотиков

На сегодняшний день на основе представителей индигенной нормофлоры кишечника производится большое количество пробиотических препаратов, которые подразделяются на 3 группы: лекарственные средства, БАД (биологически активные добавки) (парафармацевтики или нутрицевтики), продукты функционального питания. Указанные пробиотики отличаются разнообразием по количественному и видовому представительству входящих в них штаммов микробов.

Современная классификация пробиотических лекарственных средств основана на различиях препаратов по составу и комбинациям живых микробных клеток со стимуляторами их роста и метаболитами [89].

Основными микроорганизмами, входящими в состав абсолютного большинства препаратов, являются бифидо- и лактобактерии, но могут включаться также и другие микроорганизмы (стрептококки, энтерококки, эшерихии и др.) В зависимости от количества входящих в препарат штаммов индигенных микроорганизмов, их видовой принадлежности и сочетаний - различают монокомпонентные, поликомпонентные, комбинированные, самоэлиминирующиеся, а также метаболитные пробиотики (табл. 1) [18, 45, 101, 102].

Таблица 1 - Классификация пробиотиков

Монопробиотики	Поли-пробиотики	Само-элиминирующиеся	Комбинированные	Метаболитные
Бифидо-содержащие: Бифидумбактерин Пробифор Бифидумбактерин форте Биобаланс-Б Бифидобак Бифидоген Бифидомакс форте Эуфлорин-В	Лакто-содержащие: Ацилакт Примадофилус Лактофлор Бифидо-содержащие: Бифилонг Бифилиз	Бактисубтил Флонивин Споробактерин Энтерол Бактиспорин Биоспорин	Бифидо- и лактосодержащие +пребиотик: Нормолорин-Д Примадофилус бифидус Примадофилус детский Линекс био Бифиформ малыш	Хилак форте Хилафор Актофлор Микростим

Продолжение таблицы 1

Монопробиотики	Поли-пробиотики	Само-элиминирующиеся	Комбинированные	Метаболитные
Лактосодержащие: Лактобактерин Биобаланс-А Наринэ форте капсулы Биобактон Лактонорм Эуфлорин-Л Экофермин Колисодержащие: Колибактерин Биофлор	Бифидо- и коли-содержащие: Бификол		Лактосодержащие+пребиотик: Нормофлорин-Л Бифидосодержащие+пребиотик: Нормофлорин-Б Бифидо- и лактосодержащие: Экофермин баланс Бифацид	

В состав монопробиотиков входит только один штамм:

B. bifidum - Бифидумбактерин, Пробифор, Бифидумбактерин-форте;

L. acidophilus, *L. rhamnosus* – Примадофилус;

L. acidophilus – Биобактон;

L. plantarum или *L. fermentum* – Лактобактерин;

E. coli – Колибактерин.

Поликомпонентные пробиотики представляют из себя препараты на основе симбиотических сообществ, доминирующих в микроэкологии индигенных микроорганизмов, что позволяет приблизить их состав к естественному микробиоценозу кишечника для достижения комплексного эффекта. К особенностям биологического эффекта поликомпонентных пробиотиков относят синергию полезных свойств, присущих отдельным штаммам.

К поликомпонентным пробиотикам относятся:

Примадофилус бифидус - *B. breve*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*;

Бификол - *B. bifidum*, *E. coli*;

Бифацид - *B. bifidum*, *L. acidophilus*;

Ацилакт - 3 штамма *L. acidophilus*;

Бифилонг - *B. bifidum*, *B. longum*.

Длительная практика применения пробиотиков на основе живых клеток

микроорганизмов выявила положительные и отрицательные аспекты их использования.

Достоинства пробиотических препаратов, содержащих бактериальные клетки:

- помощь организму в формировании микрофлоры слизистых оболочек за счет временного нахождения в мукозном слое;

- активное вытеснение патогенной микрофлоры за счет входящих в состав метаболитов, а также иммуностимулирующее влияние на макроорганизм поверхностных белков бактериальных клеток;

- возможность использования препаратов в качестве заквасок для приготовления в домашних условиях продуктов функционального питания, которые рекомендуется применять в ежедневном рационе.

К недостаткам данных пробиотических препаратов можно отнести следующее:

- относительно низкая устойчивость к абиотическим жидкостям в пищеварительном тракте макроорганизма;

- при одновременном приеме с антибактериальными и противомикробными препаратами снижается количество живых бактерий в применяемом пробиотике;

- сложность в подборе индивидуальной дозы препарата для пациента;

- невозможно получить «идеальный» штамм пробиотика, который бы подходил всем.

С учетом вышеизложенного представляется перспективным использование в качестве пробиотических средств экзометаболитов, а также лизатов бактерий пробиотических штаммов [60].

1.3.2 Технологические приемы получения бесклеточных пробиотиков

В медицинской практике расширяется применение лекарственных препаратов на основе лизатов бактериальных клеток (Имудон, ИРС-19,

Бронхомунал и др.) или продуктов жизнедеятельности микроорганизмов (Хилафор, Хилак, Бактистатин). Технология данных препаратов различна. Для получения бактериальных лизатов используются методы дезинтеграции, которые подразделяются на химические (гидролиз кислотный или щелочной), физические (вибрация, ультразвук, повышенная температура и др.) и биологические (ферменты). При получении продуктов жизнедеятельности микроорганизмов учитывается локализация накопления БАВ (биологически активные вещества): внутри клетки продуцента (эндометаболиты) или во внеклеточном пространстве (экзометаболиты).

Известен лекарственный препарат, обладающий хорошими иммуномодулирующими свойствами, на основе гидролизата молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus acidophilus*, полученный с использованием различных способов дезинтеграции. Оценка качества полученных образцов проводилась в сравнении с препаратом Хилак форте. Их химический состав оказался достаточно сходным [70].

Недостатками группы пробиотических препаратов на основе лизатов бактерий является возможность сенсебилизации организма, а также необходимость очистки конечного продукта от деструктирующих веществ (при использовании методов химической и биологической дезинтеграции). Поэтому более актуальным и перспективным считается направление конструирования пробиотических препаратов на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

На основе продуктов жизнедеятельности бактерий, представителей нормальной микрофлоры организма человека, разработан ряд лекарственных средств [72, 73]. В России зарегистрирован и широко используется один из таких препаратов - капли «Хилак форте» фирмы Меркле ГмбХ, Германия. «Хилак форте» содержит продукты жизнедеятельности четырех штаммов бактерий – *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus helveticus*, а также молочную, лимонную, фосфорную кислоты и буферные соли (кислый фосфат натрия, кислый фосфат калия) [10, 70, 76]. Препарат нормализует количественный и качественный состав кишечной флоры, рН и водно-

электролитный баланс в просвете кишечника, одновременно стимулирует синтез эпителиальных клеток кишечной стенки и антагонистическую активность представителей нормальной микрофлоры.

Сотрудниками Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов (Санкт-Петербург) Т.Я. Вахитовым, Л.Н. Петровым и др. проводились работы по созданию препаратов, содержащих экзометаболиты бактерий, находящихся в условиях стресса. Результатом исследований данных авторов стал препарат «Актофлор», ускоряющий рост лакто- и бифидобактерий, стимулирующий их антагонистическую активность и обладающий иммуномодулирующим действием [89].

В 2009 году была зарегистрирована БАД «Хилафор», разработанная ОАО «Партнер», представляющая собой смесь бесклеточных культуральных фильтратов, полученных на основе гидролизата молочного белка казеина, дрожжевого аутолизата и культур пробиотических микроорганизмов *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus plantarum* [102].

Учеными Пермского НПО «Биомед» [71, 99, 100] разработан способ получения препарата «Микростим» на основе комплекса метаболитов производственного пробиотического штамма *Lactobacterium plantarum* 8P-A3, обладающего высокой биологической активностью. В основе получения лежит принцип отделения культуральной жидкости от биомассы при помощи ультрафильтрации с последующей термической обработкой пермеата. Концентрат биомассы может быть использован для получения препарата «Лактобактерин» в различных лекарственных формах. В ходе экспериментального исследования была установлена выраженная пробиотическая и антимикробная активность препарата. При исследовании общетоксического действия «Микростима» (оценка острой, хронической токсичности и аллергенности) на трех видах животных установлено, что препарат является относительно безвредным (VI класс токсичности). При пероральном введении белым мышам выявлено иммуномодулирующее действие препарата. Показано, что применение «Микростима» на фоне приобретенного иммунодефицита, индуцированного циклофосфамидом способствует

восстановлению количества лейкоцитов крови и клеток костного мозга, фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови и показателей гуморального иммунного ответа на эритроциты барана [99].

Из вышеизложенного очевидна перспективность немногочисленность препаратов не содержащих бактериальные клетки для коррекции дисбиозов, поэтому представляется целесообразным расширить ассортимент пробиотиков метаболитного типа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Микроорганизмы

В качестве продуцентов экзометаболических комплексов использовали производственные штаммы: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Lactobacillus acidophilus* К₃Ш₂₄, *Bifidobacterium bifidum* 1.

Штамм *L. plantarum* 8P-A3 представляют собой неподвижные грамположительные палочки длиной от 0,7 до 3,0 мкм, располагающиеся беспорядочными скоплениями и отдельными короткими цепочками. Жгутиков не имеют, капсул и спор не образуют, факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа или азота, а также в присутствии кислорода. Оптимальная температура для роста составляет (37±1) °С [94].

Штамм *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ — грамположительные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2-4 и более клеток. Жгутиков не имеют, капсул и спор не образуют. Анаэроб. Оптимальная температура роста составляет (37±1) °С. Клетки равномерно окрашиваются метиленовой синью.

Штамм *B. bifidum* 1 представляет собой неподвижные грамположительные полиморфные палочки длиной 4-5 мкм с утолщением на одном или двух концах, или бифуркацией, от отдельных клеток до скоплений конгломератов. Анаэроб. Оптимальная температура роста составляет (38±1) °С. На плотной питательной среде (Блаурокк агаризированный 0,9% агара) отдельные колонии бифидобактерий имеют форму мелких «гвоздей», «крошек» белого цвета. На жидкой среде Блаурокка микробы вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноза). Желатин не разжижает, газа не образует, глюкозу сбраживает до уксусной и L(+) – молочной кислот, закисляя среду до pH 3,8-4,1 [95].

При постановке теста антибиотикочувствительности использовали штамм *Escherichia coli* M-17 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

Антимикробную активность исследовали с применением тест-штамма - *Escherihia coli lum+*.

2.2. Препараты

Ультрафильтраты культуральной жидкости производственных штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1.

Пробиотики: «Лактобактерин сухой», «Бифидумбактерин сухой» (филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед»).

Микробиоллюминесцентный индикатор токсичности (МИТ) на основе культуры люминесцентных бактерий штамма *E. coli lum+* С-50, разработанный под руководством д.м.н., профессора Пшеничникова Р.А. (ИЭГМ УрО РАН) (ТУ 6-09-20-236-93, ТУ 846-001-0453805-00).

«Хилак форте-капли» («Меркле ГмбХ», Германия).

Коммерческие диски антибиотиков: ампициллин (10мкг/диск), цефалексин (30 мкг/диск), гентамицин (10 мкг/диск), фурадонин (300мкг/диск), ципрофлоксацин (5 мкг/диск) (НИЦФ, Санкт-Петербург).

2.3 Питательные среды

Для культивирования микроорганизмов и контроля биологических показателей пробиотиков использовали следующие питательные среды: МРС-1, МРС-4, МРС-5 [95], обезжиренное молоко, мясо-пептонный агар (МПА), питательный агар с 9% натрия хлорида, плотная среда Сабуро, раствор глюкозы 0,5%, жидкая и плотная среда Блаурокка («Пермское НПО «Биомед»).

Для реакторного культивирования производственных штаммов бактерий использовали казеиново-дрожжевые питательные среды (КД): КД-5 для *B. bifidum* 1 и КД-лакто для *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ («Пермское НПО

«Биомед»).

2.4. Материалы для получения комплексного метабиотика

При разработке состава метаболитного пробиотического препарата использовали: ультрафильтраты культуральной жидкости производственных штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1 и вспомогательные вещества, разрешенные к применению в фармацевтической промышленности:

- ароматизатор карамель идентичный натуральному ГОСТ Р 52177-2003;
- сорбат калия E202;
- сахар рафинад ГОСТ 22-94;
- лимонная кислота E330, ГОСТ 908-2004;
- сахароза ГОСТ 21-94;
- молочная кислота E270, ГОСТ 490-2006.

2.5. Физико-химические методы

Определение аминного азота

Проводили формольным титрованием согласно ГОСТ 29311-92 «Гидролизаты панкреатические для бактериальных питательных сред. Общие технические условия», с. 5. Формалин нейтрализовали 10% раствором натрия гидроксида до рН 7,0. Анализируемый образец в объёме 2 мл помещали в стакан вместимостью 50 мл и добавляли 18 мл воды очищенной, в полученном растворе измеряли рН при помощи потенциометра и добавляли 0,1 М раствор натрия гидроксида до рН 7,0. В нейтрализованный раствор добавляли 2 мл раствора формалина нейтрализованного. Содержимое тщательно перемешивали и титровали 0,1 М раствором натрия гидроксида до рН 9,1. Конец титрования фиксировали при помощи потенциометра. Содержание аминного азота в исследуемой пробе в

процентах вычисляли по формуле:

$$X_{\%} = \frac{V \times K \times 0,0014 \times 100}{a}, \quad (1)$$

где V – объем раствора натрия гидроксида 0,1 М, пошедшее на титрование испытуемой пробы, см³;

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

0,0014 – количество азота, соответствующее 1 см³ раствора натрия гидроксида в миллиграммах;

100 — коэффициент пересчета в процентах;

a – объем анализируемого образца в см³, содержащегося в титруемом объеме.

Определение общего азота

Содержание общего азота в образцах определяли в реакции с реактивом Несслера согласно ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля иммунобиологических препаратов», с. 7.

Определение белкового азота

Проводили по методике ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля иммунобиологических препаратов», с.2-7.

Определение молекулярного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Анализ белкового состава пробиотика проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием системы: жидкостной хроматограф Knauer, насос Knauer Smartline Pump 1000, менеджер растворов Knauer Smartline Manager 5050, детектор Knauer Smartline UV Detector 2550, инжектор Knauer Smartline Valve Drive. Разделение проводилось на колонке Superdex 200 10/30 GL. В качестве подвижной фазы применялись: 0,05М фосфатно-калиевый буфер, 0,15М натрия хлорид, 0,003М азид натрия. Детектирование проводилось при длине волны 280 нм, давлении 1,4 МПа и скорости потока 0,45 мл/мин.

В качестве маркеров использовали Ферритинин (М.м. 440 кДа), Альдолаза

(М.м 158 кДа), Кональбумин (М.м 75 кДа), Овальбумин (М.м 43 кДа), Карбоангидраза (М.м 29 кДа), Рибинуклеаза А (М.м 13,7 кДа) и Апротинин (М.м 6,5 кДа), которые разгоняли в колонке при указанных выше условиях.

Количественное определение белка

Проводили по методике ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля иммунобиологических препаратов», умножая количество белкового азота на коэффициент 6,25.

Определение вязкости

По ГФ XII, вып. 1, с. 40-47 (ОФС 42-0038-07) с помощью вискозиметра ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,99 мм и $K=0,1019$.

Рассчитывали динамическую вязкость по формуле:

$$\eta = \rho \times v = \rho \times K \times t, \quad (2)$$

где η – динамическая вязкость в миллипаскаль-секундах (мПа×с);

K – коэффициент вискозиметра;

ρ – плотность испытуемой жидкости, в миллиграммах на миллиметр кубический (мг×мм³);

t – время прохода исследуемой жидкости от точки M_1 до точки M_2 (с).

Определение плотности

Проводили по ГФ XII, вып. 1, с. 40 (ОФС 42-0037-07), с помощью ареометра с точностью до $\pm 0,01$ г/см³.

Показатель концентрации водородных ионов

Определяли потенциметрически при помощи иономера И-160МИ в соответствии с ГФ XII, вып. 1, с. 89-83 (ОФС 42-0048-07). Для калибровки прибора использовали стандартные буферные растворы.

Определение сухого остатка

По методике ГФ XI, вып. 2, с. 149. 5 мл препарата помещали во взвешенный бюкс, выпаривали на водяной бане досуха и сушили в течение 2 ч при температуре $(102,5 \pm 2,5)$ °С, затем охлаждали в эксикаторе в течение 30 мин и взвешивали. Полученный результат (в граммах) пересчитывали на 1 мл ультрафильтрата культуральной жидкости.

Спектр поглощения препаратов

Изучали на спектрофотометре СФ-46 в диапазоне длин волн 200-400 нм при различных разведениях препарата в воде очищенной.

2.6. Технологические методы

Культивирование бактерий

Накопление биомассы производственных штаммов проводили периодическим способом. Глубинное культивирование на казеиново-дрожжевых средах в бутылках и реакторе включало применение рН-корректирующих (раствор аммиака) и углеводных добавок (раствор глюкозы).

Получение ультрафильтратов культуральной жидкости лакто- и бифидобактерий

Для получения образцов применяли метод ультрафильтрации с использованием установки УПЛ-0,6 (г. Кириши, Россия), оснащенной одним или тремя монтируемыми разделительными аппаратами на полых волокнах с общей фильтрационной поверхностью 0,2 – 1,0 м² (рис.1).

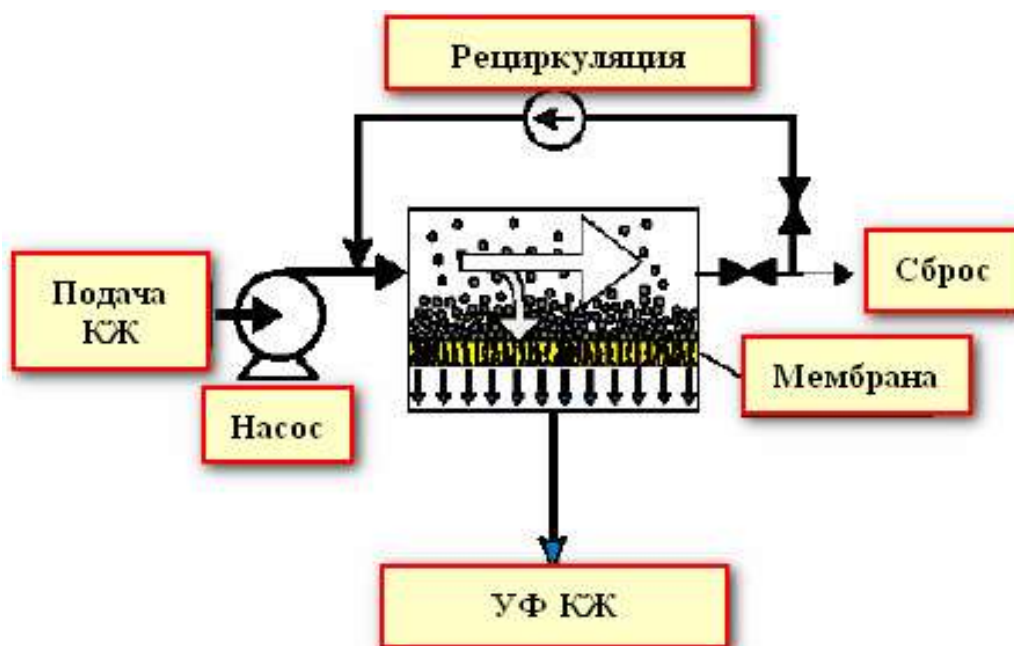


Рисунок 1 – Принципиальная схема ультрафильтрации.

Типы волокон: ВПУ-5ПА (волокно полое ультрафильтрационное с

номинальным пределом задержания 5 кДа из полиакриламида), ВПУ-15ПА (с номинальным пределом задержания 15 кДа из полиакриламида), ВПУ-100ПС (с номинальным пределом задержания 100 кДа из полисульфона) и ВПУ-300ПС (с номинальным пределом задержания 300 кДа из полисульфона).

2.7. Микробиологические методы

Определение влияния метаболитных комплексов на активность кислотообразования и динамику накопления биомассы пробиотических тест-штаммов

Исследовали путем посева тест-штаммов (*L. plantarum*, *B. bifidum*) на питательные среды: обезжиренное молоко и 0,5% раствор глюкозы с добавлением полученных ультрафильтратов [99].

Жидкую культуру лактобактерий и бифидобактерий получали путем регидратации препарата «Лактобактерин сухой» или «Бифидобактерин сухой» (производства «НПО «Биомед») в 5 мл 0,9% стерильного раствора натрия хлорида.

Для определения влияния экзометаболитов на рост клеток 3 мл исследуемого ультрафильтрата и такой же объем культуры лакто- или бифидобактерий вносили в 24 мл 0,5% стерильного раствора глюкозы и выдерживали в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течении 24 ч (для лактобактерий) или при $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течении 72 ч (для бифидобактерий). Динамику роста культуры оценивали по изменению показателя оптической плотности.

Для определения активности кислотообразования к 8 мл обрата молока добавляли 1 мл ультрафильтрата и вносили 1 мл культуры лакто- или бифидобактерий. Инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течении 24 ч или при $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течении 72 ч для лактобактерий и бифидобактерий соответственно. Динамику роста культуры оценивали по изменению показателя кислотности до и после инкубации.

Кислотность определяли титрованием 0,1М раствором натрия гидроксида с

определением точки эквивалентности при помощи потенциометра и индикатора фенолфталеина.

Кислотность вычисляли по формуле:

$$T = A \times K \times 10, \quad (3)$$

где T – условная величина, выраженная в градусах Тернера ($^{\circ}T$), которая определяется количеством мл 0,1М раствора натрия гидроксида, пошедшим на титрование 10 мл образца;

A – количество мл 0,1М раствора натрия гидроксида, пошедшим на титрование 10 мл образца;

K – поправка к титру 0,1М раствора натрия гидроксида.

Оптическую плотность определяли турбидиметрией на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кюветах с толщиной слоя 10 мм при 540 нм.

Коэффициент стимуляции (КС) вычисляли по формуле:

$$КС = \frac{O_{\text{кон}} - O_{\text{нач}}}{K_{\text{кон}} - K_{\text{нач}}}, \quad (4)$$

где $O_{\text{кон}}$ – усредненный конечный показатель опытного образца;

$O_{\text{нач}}$ – усредненный начальный показатель опытного образца;

$K_{\text{кон}}$ – усредненный конечный показатель контрольного образца;

$K_{\text{нач}}$ – усредненный начальный показатель контрольного образца.

Определение влияния экзометаболитов на биолюминесценцию тест-штамма.

Выявление характера действия исследуемых образцов ультрафильтратов культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий на тест-штамм базировалось на определении величины изменения интенсивности биолюминесценции культуры *E. coli lum+* и выражалось количественно в виде индекса антибактериальной активности – (ИАА) - безразмерной величины, рассчитываемой по формуле:

$$ИАА = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100, \quad (5)$$

где I_0 и I - интенсивность свечения контроля и опыта, соответственно, при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с тест-объектом.

Методика определения: к 0,5 мл исследуемого образца метабиотика

добавляли 0,5 мл бактериальной суспензии светящегося штамма. Для контроля к бактериальной взвеси добавляли 0,5 мл стерильного раствора натрия хлорида 0,9%. Определение проводили через 30 мин экспозиции при комнатной температуре (общее время 2 часа).

Микробиологическая чистота

Определяли согласно методике ГФ XII с. 160.

Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов

Чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на плотной питательной среде с использованием стандартного набора дисков с антибиотиками. На поверхность среды МРС-5 наносили микробную культуру методом газона и после подсыхания поверхности среды наслаивали диски с антибиотиками из расчета 4 диска на чашку Петри. Результаты учитывали через 24 ч после инкубации в термостате при (37 ± 1) °С.

Определение количества жизнеспособных клеток.

Определение количества живых клеток лактобактерий в сухом препарате и жидкой культуре проводили по ФСП [95].

Содержимое флакона растворяли 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу препарата. Из полученной таким образом исходной взвеси в пробирках, содержащих по 9 мл 0,9 % натрия хлорида, готовили ряд последовательных десятикратных разведений от 10^{-1} до 10^{-7} , используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Из каждого разведения 10^{-6} и 10^{-7} высевали по 0,1 мл микробной суспензии пипеткой вместимостью 1 мл на две чашки Петри со средой МРС-4 (от каждого разведения). После (44 ± 4) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С производили подсчет выросших колоний и вычисляли содержание живых бактерий в одной дозе препарата. При подсчете учитывают чашки, на которых выросло не менее 15 колоний.

Умножение числа выросших колоний производили на количество десятикратных разведений и на 10, так как высеив на чашку Петри сделан в объеме

0,1 мл.

Определение количества живых клеток бифидобактерий в одной дозе по ФСП [94].

Содержимое флакона растворяли 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу препарата. 1 мл полученной таким образом исходной взвеси переносили в пробирку, содержащую 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивали 12-15 раз, получая при этом 1 дозу бифидумбактрина в объеме 10 мл. Из этой пробирки делали последующие десятикратные разведения в модифицированной печеночной среде Блаурокка от 10^{-1} до 10^{-9} , используя для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Пробирки с разведениями испытуемых образцов препарата помещали в термостат при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и инкубировали в течение 4 суток.

По окончании инкубации отмечали разведения, в которых имеется рост колоний бифидобактерий в виде «крошек», «гвоздиков». Количество живых бифидобактерий в одной дозе вычисляли путем умножения количества колоний на величину разведения микробной суспензии в данной пробирке.

Определение количества живых клеток ацидофильных бактерий.

Содержимое флакона разводили 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу препарата. По 1 мл полученной исходной взвеси переносили в 2 пробирки, содержащие по 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивали 12-15 раз, получая при этом 1 дозу ацидофильных бактерий в объеме 10 мл. Из этих пробирок делали 2 ряда последовательных десятикратных разведений в пробирках со стерильным обезжиренным молоком от 10^{-1} до 10^{-9} , использовали для каждого разведения отдельную пипетку вместимостью 1 мл. Четыре пробирки с молоком оставляли незасеянными (по две в каждом ряду) для контроля среды. Посевы выдерживали в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 3-4 сут. За это время молоко, в котором содержались ацидофильные лактобактерии, образует сгусток. Из сгустка готовили мазки, окрашивали по Граму или метиленовой синью. Если в мазках видны только характерные палочки, то данное разведение учитывают, как содержащее ацидофильные лактобактерии.

При подсчете количества ацидофильных лактобактерий пользовались таблицей Мак-Креди. Сначала составляли числовую характеристику. Она состоит из трех цифр, указывающих количество пробирок со свернувшимся обезжиренным молоком в каждом из трех последних разведений. Первая цифра числовой характеристики соответствует тому последнему разведению, при котором молоко свернулось в 2 пробирках. Следующие цифры означают число пробирок со свернувшимся молоком в двух последующих разведениях. Возможные комбинации представлены в таблице. По числовой характеристике находили в таблице наиболее вероятное число микробных клеток и умножали его на разведение, с которого началась первая цифра числовой характеристики. Полученное число соответствует количеству клеток ацидофильных лактобактерий в одной дозе препарата.

2.8. Статистические методы анализа.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием непарного t-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2013. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты в таблицах представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки ($M \pm m$).

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ

В сфере производства пробиотиков актуальна проблема утилизации КЖ (культуральной жидкости), получаемой при концентрировании бактериальных взвесей, если такая технологическая стадия присутствует в способе изготовления препарата. В этом случае разработку биологически активных препаратов из КЖ следует рассматривать в качестве необходимой составляющей оптимизации способов получения пробиотиков, направленной на более полную реализацию биологического потенциала производственных штаммов и создание комплексных безотходных технологий [100].

Культуральная жидкость представляет собой сложную гетерофазную систему богатую различными веществами, которые включают нутриенты, необходимые для накопления биомассы бактериальных культур, и биологически активные субстраты, продуцируемые микроорганизмами.

Отделение клеточной биомассы от КЖ возможно несколькими способами, включающими осаждение, центрифугирование или ультрафильтрацию и др. Нами был использован метод ультрафильтрации для выделения комплекса метаболитов из культуральной жидкости производственных пробиотических штаммов бактерий. Данный метод позволяет получать из бактериальных взвесей одновременно два продукта – бесклеточную фракцию для изготовления метаболитных пробиотических препаратов и концентрат биомассы для использования в составе бактериальных лекарственных средств (лактобактерин, бифидумбактерин, ацилакт).

С учетом биотехнологических особенностей получения пробиотических препаратов метаболитного типа начальный этап нашей работы включал исследование процесса ультрафильтрации применительно к бактериальным взвесям производственных штаммов лакто- и бифидобактерий с целью выяснения возможности использования разделительных аппаратов на основе полых волокон с

НОММ: 15 кДа (марка разделительного аппарата ВПУ-5ПА), 15 кДа (марка разделительного аппарата ВПУ-15ПА), 100 кДа (разделительного аппарата марка ВПУ-100ПС) и 300 кДа (марка разделительного аппарата ВПУ-300ПС).

3.1 Получение бактериальных взвесей

Взвеси производственных штаммов лакто- и бифидобактерий получали с помощью периодического культивирования на казеиново-дрожжевых средах, питательная основа которых - дрожжевой аутолизат и казеиновый гидролизат - содержат необходимый комплекс нутриентов для роста и развития *L. plantarum* 8P- A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1.

Для периодического культивирования характерно изменение физиологического состояния бактерий. Выращивание прекращали, когда культура клеток переходила в стационарную фазу развития. Выбор окончания культивирования при переходе в эту фазу обусловлен тем, что она характеризуется максимальной плотностью популяции, а также максимальной концентрацией экзометаболических комплексов в культуральной жидкости. Динамика роста культур на казеиново-дрожжевых средах представлена на рисунках 2-4.

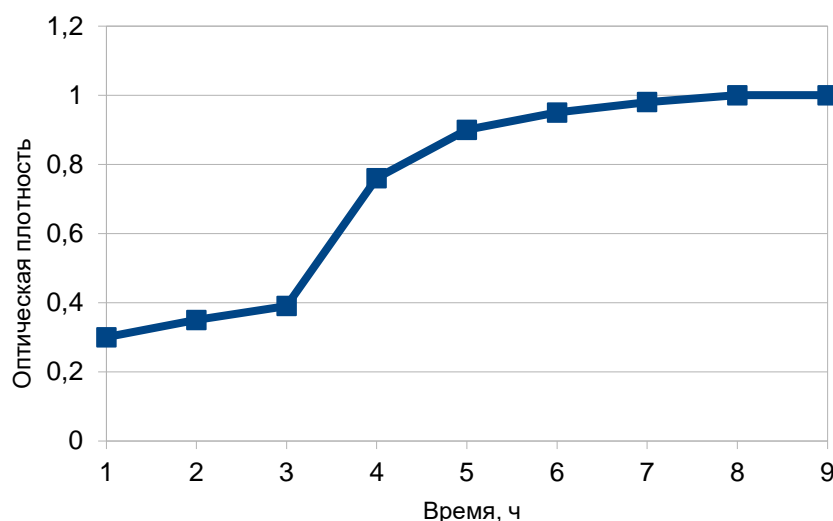


Рисунок 2 – Динамика накопления биомассы при реакторном культивировании штамма *L. plantarum* 8P-A3.

Накопление биомассы производственного штамма лактобактерий *L. plantarum* 8P-A3 проводили в течении 8-12 ч при постоянном активном перемешивании и внесении рН корректирующих и углеводных добавок. Достижимый уровень накоплений биомассы клеток составлял 10^9 - 10^{10} КОЕ/мл.

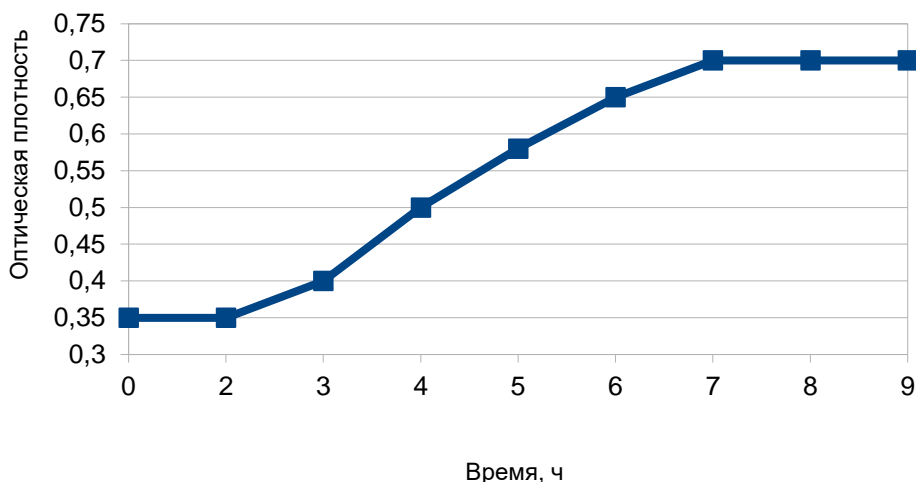


Рисунок 3 – Динамика накопления биомассы при реакторном культивировании бактерий *L. acidophilus* K3Ш24.

Производственное накопление биомассы ацидофильных лактобактерий проводили в асептических условиях аналогичным *L. plantarum* 8P-A3 в течении 8-12 ч, при активном перемешивании и внесении рН корректирующих добавок (устанавливают рН в пределах $5,0 \pm 0,2$) и углеводов.

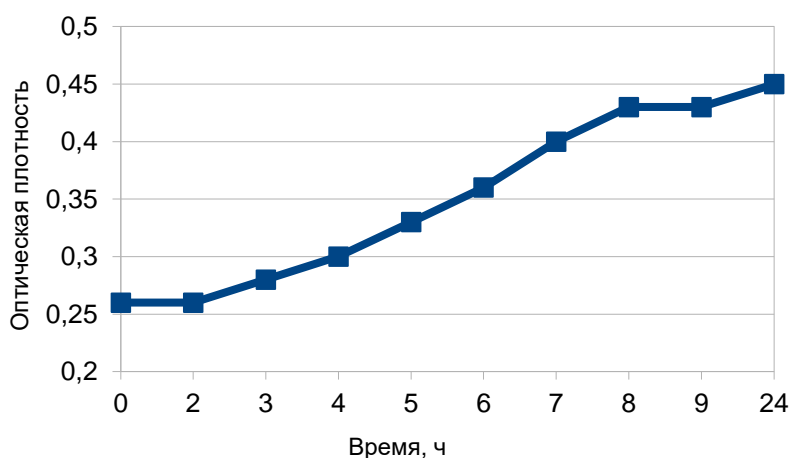


Рисунок 4 – Динамика накопления биомассы при реакторном культивировании бактерий *B. bifidum* 1.

Реакторное культивирование бифидобактерий проводили в течение (22 ± 2) ч при температуре (38 ± 1) °С в атмосфере азота и с периодическим перемешиванием барботажем. В начале культивирования устанавливали рН $(6,6 \pm 0,5)$. По окончании культивирования показатель рН бактериальной взвеси снижался и его доводили до первоначального уровня с помощью раствора аммиака.

Таблица 2 - Условия культивирования производственных штаммов

Условия	Бактериальный штамм		
	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	<i>L. acidophilus</i> K ₃ Ш ₂₄	<i>B. bifidum</i> 1
Питательная среда	Казеиново-дрожжевая		
Наличие кислорода	+	-	-
Перемешивание	Постоянное	Периодическое	Постоянное
Температура, °С	(37 ± 1)	(37 ± 1)	(38 ± 1)
рН	$6,0 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,5$
Корректирующая добавка (рН)	Раствор аммиака		
Углеводная добавка	Раствор глюкозы		
Продолжительность культивирования, ч	10 ± 2	10 ± 2	22 ± 2

Полученные бактериальные культуры подвергали ультрафильтрации. В паспорте разделительных аппаратов для ультрафильтрации АР-0,2 (марок ВПУ-5ПА, ВПУ-15ПА, ВПУ-100ПС и ВПУ-300ПС) перечислены приемлемые параметры рабочей среды, которые представлены в таблице 3. Основанием для использования АР указанных марок являлись данные, полученные в результате исследования и сопоставления физико-химических показателей бактериальных взвесей (табл. 3).

По полученным результатам сделан вывод, что физико-химические параметры бактериальных взвесей удовлетворяют требованиям рабочей среды для разделительных аппаратов с волокном марок ВПУ-5ПА, ВПУ-15ПА, ВПУ-100ПС и ВПУ-300ПС и, следовательно, данные ультрафильтрационные волокна можно использовать для получения метаболитных комплексов из культуральной жидкости

производственных штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K₃Ш₂₄ и *V. bifidum* 1.

Таблица 3 - Параметры рабочей среды и физико-химические показатели бактериальных взвесей

Показатель	Рекомендуемые параметры рабочей среды	Взвеси		
		<i>L. plantarum</i> 8P-A3	<i>V. bifidum</i> 1	<i>L. acidophilus</i> K ₃ Ш ₂₄
рН	2-13	6,48±0,10	6,84±0,16	3,75±0,04
Плотность, кг/м ³	900-1400	1015±0,01	1011±0,01	1007±0,01
Вязкость, Па·с	0,01	0,0015±0,01	0,0023±0,02	0,0023±0,02

3.2. Выбор марки ультрафильтрационного волокна для получения экзометаболитных комплексов

Выбор технологического оборудования для оснащения производственного процесса, в том числе ультрафильтрационного разделения бактериальных взвесей, необходимо проводить с учетом его эффективности и экономичности.

Марку разделительного аппарата, пригодного для промышленных целей, определяли на основании расчета производительности волокна при пропускании через него исследуемых бактериальных взвесей (рис. 5).



Рисунок 5 – Принципиальная схема строения полволоконного разделительного аппарата

Взвеси производственных штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K₃Ш₂₄ и *V. bifidum* 1 в равных объемах и при равных условиях пропускали через

разделительные аппараты с волокнами марок ВПУ-5ПА, ВПУ-15ПА, ВПУ-100ПС и ВПУ-300ПС, которые имели фильтрующую поверхность 0,2 м². Производительность аппаратов определяли по соотношению объема (л) полученного фильтрата и времени получения УФ КЖ (ультрафильтратов культуральных жидкостей) (ч). В таблице 4 представлены результаты опыта.

Таблица 4 - Характеристика производительности разделительных аппаратов

Марка разделительного волокна	Производительность по фильтрату в зависимости от типа волокна, л/ч			
	Вода очищенная	Бактериальная взвесь		
		<i>L. plantarum</i> 8P-A3	<i>B.bifidum</i> 1	<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄
ВПУ-5ПА	2,00	0,01	0,01	0,02
ВПУ-15ПА	6,00	0,43	0,26	0,44
ВПУ-100ПС	20,00	0,54	0,46	0,61
ВПУ-300ПС	24,00	0,71	0,54	0,71

Примечание – * - вода очищенная при температуре 20 °С и давлении 0,1 МПа

Данные по исследованию разделительных аппаратов показали, что волокна марок ВПУ-15ПА, ВПУ-100ПС, ВПУ-300ПС обладают достаточно высокой производительностью, а разделительные аппараты с волокнами ВПУ-5ПА значительно уступают им по данному показателю.

3.3. Получение, физико-химическая и биологическая характеристика ультрафильтратов культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий

По результатам апробации процесса ультрафильтрации необходимо было определить перспективную модель технологического процесса по выделению экзометаболитных комплексов, выбрать оптимальные варианты ультрафильтратов и необходимые вспомогательные вещества для последующего конструирования состава комплексного метаболитного пробиотика.

Полученные образцы были исследованы с использованием методик, представленных в главе 2. Все образцы обладали специфическим запахом (молочно-дрожжевой) и специфическим вкусом (солено-кислый). Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Физико-химические показатели УФ КЖ

Показатель	Штамм-продуцент	Ультрафильтрат культуральной жидкости после разделительного аппарата (НОММ, кДа)		
		15	100	300
рН	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	6,31±0,03	6,32±0,02	6,55±0,03
	<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	3,72±0,01	3,62±0,03	3,61±0,03
	<i>B. bifidum</i> 1	6,42±0,01	6,21±0,02	6,04±0,01
Плотность, г/см ³	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	1,014±0,02	1,014±0,01	1,015±0,02
	<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	1,007±0,01	1,009 ±0,01	1,010±0,02
	<i>B. bifidum</i> 1	1,011±0,01	1,011±0,01	1,012±0,01
Вязкость, мПа*с	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	1,1599±0,01	1,2358±0,01	1,2358±0,01
	<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	1,1633±0,03	1,1737 ±0,04	1,2427±0,02
	<i>B. bifidum</i> 1	1,1391±0,04	1,1391±0,02	1,2358±0,07
Кислотность, °Т	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	42,60±5,95	42,63±6,10	40,17±5,94
	<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	86,16±3,08	111,51±9,02	116,66±4,94
	<i>B. bifidum</i> 1	27,89±1,39	26,18±1,52	29,79±1,76
Общий азот, мг/мл	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	6,00±0,01	6,60±0,01	6,60±0,05
	<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	4,00±0,05	6,00±0,05	6,60±0,05
	<i>B. bifidum</i> 1	3,00±0,30	3,20±0,10	4,55±0,05
Сухой остаток, мг/мл	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	0,0076±0,0001	0,0088±0,0001	0,0090±0,0001
	<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	0,0052±0,0001	0,0076±0,0002	0,0084±0,0002
	<i>B. bifidum</i> 1	0,0062±0,0001	0,0064±0,0001	0,0070±0,0001

Продолжение таблицы 5

Показатель	Штамм- продуцент	Ультрафильтрат культуральной жидкости после разделительного аппарата (НОММ, кДа)		
		15	100	300
Белковый азот, мг/мл	L. plantarum 8P-A3	0,20±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01
	L. acidophilus K ₃ Ш ₂₄	0,06±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01
	V. bifidum 1	0,05±0,01	0,07±0,01	0,15±0,01
Белок, мг/мл	L. plantarum 8P-A3	1,25±0,03	1,87±0,03	1,87±0,02
	L. acidophilus K ₃ Ш ₂₄	0,37±0,03	1,87±0,01	1,87±0,02
	V. bifidum 1	0,31±0,01	0,44±0,01	0,94±0,05
Аминный азот, %	L. plantarum 8P-A3	0,11±0,01	0,14±0,02	0,14±0,01
	L. acidophilus K ₃ Ш ₂₄	0,03±0,01	0,04±0,01	0,05±0,01
	V. bifidum 1	0,12±0,01	0,13±0,01	0,13±0,02

Полученные данные наглядно демонстрируют различную биохимическую активность выбранных штаммов лакто- и бифидобактерий. Лактобактерии по сравнению с бифидобактериями накапливают в КЖ большее количество соединений кислотного характера. Об этом свидетельствует показатель кислотности, значение которого находится в интервалах 40-116°Т для лактобактерий и 26-29°Т для бифидобактерий.

Основой антагонистической активности пробиотических штаммов бактерий является выработка органических кислот (см. главу 1). Количественной характеристикой этой активности может выступать значение показателя кислотности, которое выражается в градусах Тернера (°Т). Цифровые величины этого показателя, полученные в ходе исследования физико-химических свойств УФ КЖ лакто- и бифидобактерий, позволяют сделать вывод о более выраженности антимикробной активности у штаммов L. plantarum 8P-A3 и L. acidophilus K₃Ш₂₄ по сравнению со штаммом бифидобактерий V. bifidum 1.

Анализ значений физико-химических параметров УФ КЖ исследуемых

штаммов демонстрируют взаимосвязь содержания сухого остатка, белкового, общего азота и белка в зависимости от пропускной способности волокон, соответствующих определенной марке разделительных аппаратов.

При исследовании на УФ-спектрометре полученных ультрафильтратов КЖ *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1, было установлено, что максимумы (max) и минимумы (min) поглощения для всех УФ находятся в одном диапазоне (табл. 6 и приложения Б).

Таблица 6 - Характеристика ультрафиолетовых спектров ультрафильтратов культуральных жидкостей

Штамм-производитель	НОММ, кДа	Длина волны, нм	
		Max	Min
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	15	245,5	259,7
	100	244,8	262,5
	300	244,8	262,5
<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	15	244,1	272,9
	100	246,9	272,9
	300	247,4	274,5
<i>B. bifidum</i> 1	15	240,6	261,1
	100	241,7	261,3
	30	243,9	260,8

Сравнение ультрафиолетовых спектров показало близкие значения параметров фракций, что объясняется однотипностью исходного компонента (казеиново-дрожжевая питательная среда). Согласно данным по аминокислотному составу [99, 88] в культуральной жидкости производственных штаммов лакто- и бифидобактерий содержатся аминокислоты, функциональные группы которых способны поглощать свет в ультрафиолетовом диапазоне – тирозин (0,2 мг/мл), гистидин (0,2 мг/мл), фенилаланин (0,3 мг/мл) [88, 99]. Анализируя УФ-спектры поглощения наших образцов, мы можем говорить о качественном подтверждении наличия тирозина (250 – 300 нм) и фенилаланина (257,4 нм). Максимумы смещены,

так как аминокислоты могут находиться в питательной среде в связанном состоянии с другими молекулами.

Известно, что в составе экзометаболитов лакто- и бифидобактерий имеются стимуляторы и ингибиторы роста бактериальных культур, а также вещества, влияющие на выживаемость и антагонистическую активность микробных клеток. Вызывало интерес исследовать влияние различных фракций УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3, *B. bifidum* 1 и *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ на биологическую и антагонистическую активность лакто- и бифидобактерий.

Для оценки биологической активности в качестве модельных представителей нормофлоры макроорганизма использовали бактериальные культуры *L. plantarum* 8P-A3 («Лактобактерин сухой») и *B. bifidum* 1 («Бифидумбактерин сухой») в качестве модельных представителей нормофлоры. В ходе проводимых экспериментов изучали влияние УФ КЖ на рост и активность кислотообразования пробиотических штаммов. Кислотообразование является интегральным показателем, в том числе антагонистической активности пробиотических штаммов по отношению к УПМ (условно-патогенным микроорганизмам). Данное влияние обусловлено выработкой органических кислот в процессе жизнедеятельности пробиотических бактерий.

В качестве питательной среды для исследования биологической активности использовали обрат молока и 0,5% раствор глюкозы. Исследуемые УФ КЖ вносили в питательную среду в количестве 10% от её объема. Оценивали по показателям: рН, оптическая плотность (на 0,5% растворе глюкозы) и кислотность до и после инкубации. В качестве контроля в пробирку с 10% раствором глюкозы вносили 0,9% раствор натрия хлорида. Результаты исследования представлены в таблицах 7-9.

Таблица 7 - Влияние метаболитных комплексов на рост и активность кислотообразования *L. plantarum* 8P-A3 (раствор глюкозы 0,5%)

Штамм-продуцент	НОММ, кДа	Прирост оптической плотности, D 540 нм		Прирост общей кислотности, °Т		КС роста	КС кислотообразования
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт		
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	15	0,324±0,03	0,451±0,04*	19,25±0,14	24,55±1,43*	1,46±0,19	1,28±0,06
	100		0,490±0,06*		26,72±1,61*	1,84±0,21	1,39±0,08
	300		0,472±0,02*		22,78±1,72*	1,53±0,17	1,19±0,08
<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	15	0,186±0,01	0,728±0,05*	21,42±0,10	42,86±0,35*	3,92±0,3	2,00±0,07
	100		0,716±0,03*		47,96±0,5*/**	3,87±0,2	2,24±0,05**
	300		0,543±0,18*		37,78±1,22*	3,01±1,2	1,76±0,09
<i>B.bifidum</i> 1	15	0,240±0,03	0,513±0,04*	21,50±0,52	36,50±0,87*	2,36±0,3	1,70±0,01
	100		0,490±0,02*		31,23±0,54*/**	2,27±0,25	1,45±0,02**
	300		0,542±0,04*		30,74±1,45*/**	2,56±0,36	1,42±0,07**

Примечания

- * - $p < 0,001$ – по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
- ** - $p < 0,001$ – по t-критерию Стьюдента по сравнению с НОММ 15 кДа

Таблица 8 - Влияние метаболитных комплексов на рост и активность кислотообразования *V. bifidum* 1 (раствор глюкозы 0,5%)

Штамм-продуцент	НОММ, кДа	Прирост оптической плотности, D 540 нм		Прирост общей кислотности, °Т		КС роста	КС кислотообразования
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт		
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	15	0,250±0,02	0,505±0,03*	3,80±0,02	8,02±0,27*	2,04±0,26	2,11±0,06
	100		0,547±0,01*		8,96±0,20*/**	2,19±0,16	2,36±0,08**
	300		0,499±0,03*		8,50±2,18*	2,02±0,24	2,24±0,58
<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	15	0,085±0,02	0,228±0,02*	2,04±0,01	5,60±0,53*	2,74±0,56	2,74±0,26
	100		0,395±0,02*/**		6,12±0,20*	4,68±0,30**	3,00±0,15
	300		0,215±0,01*		2,10±0,23	2,57±0,37	1,00±0,10
<i>V. bifidum</i> 1	15	0,211±0,02	0,288±0,04	2,68±0,21	5,70±0,41*	1,47±0,20	2,17±0,16
	100		0,399±0,05*		8,87±1,55*	2,08±0,40	3,44±0,62
	300		0,319±0,08		7,53±1,12*	1,73±0,58	3,05±0,63

Примечания

- * - $p < 0,001$ – по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
- ** - $p < 0,001$ – по t-критерию Стьюдента по сравнению с НОММ 15 кДа

Величина показателя прироста оптической плотности культур *L. plantarum* 8P-A3 и *B. bifidum* 1 при добавлении разных фракций УФ КЖ производственных штаммов лакто и бифидобактерий статистически отличалась от контрольных значений. После инкубации культуры *L. plantarum* 8P-A3 и *B. bifidum* 1 на растворе глюкозы 0,5 % с добавлением метаболитных комплексов УФ КЖ *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ он в 4 раза (для *L. plantarum* 8P-A3) и в 3 раза (для *B. bifidum* 1) превышали контрольный показатель.

Величина прироста кислотности также статистически значимо отличалась от контроля. Фракции УФ КЖ *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ 100 кДа и УФ КЖ *B. bifidum* 1 15 кДа стимулировали кислотообразовательную активность лактобактерий, а бифидобактерий – УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 100 кДа по сравнению с остальными фракциями.

Следующим этапом работы являлась оценка влияния УФ КЖ на представителей нормофлоры с применением питательной среды - обраты молока (табл. 9).

Величина показателя прироста кислотности изменилась существенно для тест-штамма *B. bifidum* 1 на обрате молока при добавлении метаболитных комплексов УФ КЖ *B. bifidum* 1 в количестве 10 % от ее объема, она превосходила контроль в 7 раз.

Исследования стимулирующего влияния на представителей нормофлоры показало, что УФ КЖ с НОММ 15 и 100 кДа обладают более выраженным потенциалом по сравнению с 300 кДа.

Стимулирующим эффектом на представителей индигенной микрофлоры как было показано ранее на примере *B. bifidum* 1 и *L. plantarum* 8P-A3 обладают метаболитные фракции 15 и 100 кДа ультрафильтратов производственных штаммов *L. acidophilus* К₃Ш₂₄, *B. bifidum* 1 и *L. plantarum* 8P-A3.

Таблица 9 - Влияние метаболитных комплексов на активность кислотообразования лакто- и бифидобактерий (обрат молока)

Штамм-продуцент	НОММ, кДа	Прирост общей кислотности		КС кислотообразования
		Контроль, °Т	Опыт, °Т	
		Тест-штамм <i>L. plantarum</i> 8P-A3		
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	15	55,55±1,94	80,03±3,96*	1,44±0,05
	100		84,03±6,03*	1,50±0,08
	300		78,31±5,09*	1,40±0,06
<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	15	66,74±1,90	98,85±2,17*	1,48±0,02
	100		93,08±2,07*/**	1,40±0,04**
	300		82,64±2,67*/**	1,24±0,02***
<i>B. bifidum</i> 1	15	21,50±0,52	36,50±0,87*	1,70±0,01
	100		31,23±0,54*/#	1,45±0,02 [#]
	300		30,74±1,45*/#	1,42±0,07 [#]
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	Тест-штамм <i>B. bifidum</i> 1			
	15	26,86±4,44	50,47±7,45*	1,33±0,06
	100		52,48±1,01*	2,36±0,05
	300		75,73±3,36*	3,26±0,18

Продолжение таблицы 9

Штамм-продуцент	НОММ, кДа	Прирост общей кислотности		КС кислотообразования
		Контроль, °Т	Опыт, °Т	
Тест-штамм <i>V. bifidum</i> 1				
<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	15	25,61±3,95	84,45±10,32*	3,21±0,12
	100		60,00±2,91*	2,71±0,55
	300		52,38±0,55*	2,36±0,53
<i>V. bifidum</i> 1	15	5,65±0,58	38,86±5,39*	5,72±0,75
	100		43,57±2,88*	5,45±0,63
	300		43,14±2,94*	5,71±2,32

Примечание

1. * - $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
2. # - $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с 15 кДа;
3. ** - $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с 300 кДа;
4. *** - $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с 15 кДа.

Антимикробную активность экзометаболитных комплексов оценивали в экспресс-тесте угнетения клеточной биолюминесценции. Биолюминесценция является биохимической реакцией, связанной с общим метаболизмом бактериальной клетки, поэтому интенсивность свечения характеризует общий физиологический статус микроорганизма и его изменение под влиянием антибактериальных факторов.

Положительным свойством биолюминесцентного теста является возможность экспрессно и количественно оценивать влияние УФ КЖ пробиотических штаммов на метаболические процессы, протекающие в бактериальной клетке тест-штамма [82].

При постановке теста использовали препарат МИТ на основе генно-инженерного штамма *E. coli lum+*. При подготовке МИТ руководствовались методикой по МУ 1.2.2634-10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза», разработанных Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, 2010 год.

Направленность действия метаболитных комплексов может быть разноплановой. Изменение во времени показаний проб характеризует действие исследуемого вещества на свечение биосенсора: временный эффект или постоянство (аккумуляция эффекта) антимикробного действия. Для оценки воздействия, которое проявляют экзометаболитные комплексы, целесообразно проследить динамику изменения свечения тест-штамма, проводя замеры в течение двух часов.

К изотоническому раствору натрия хлорида с добавляли различные метаболитные комплексы, затем вносили МИТ в концентрации 10^7 микробных клеток/мл. В ходе опытов регистрировали динамику интенсивности биолюминесценции бактерий *E. coli lum+* в пробах с помощью биолюминометра «Биотокс-10М» и рассчитывали индекс антибактериальной активности препарата по формуле, приведенной в главе 2. Результаты исследования представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Индекс антимикробной активности метаболитных комплексов

УФ КЖ <i>B. bifidum</i> 1, %				
		НОММ, кДа		
		15 кДа	100 кДа	300 кДа
Время экспозиции, мин	5	96,56±0,08	93,94±0,09	96,05±0,28
	60	95,57±0,05	95,83±0,08	96,25±0,10
	120	96,17±0,02	95,51±0,08	96,77±0,06
УФ КЖ <i>L. plantarum</i> 8P-A3, %				
Время экспозиции, мин	5	98,90±0,04	88,10±0,10*	32,34±0,07
	60	99,27±0,03	84,21±0,19*	50,95±0,42
	120	99,30±0,03	82,49±0,05*	43,61±0,44
УФ КЖ <i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄ , %				
Время экспозиции, мин	5	98,92±0,19	98,28±0,36	90,67±0,06
	60	99,26±0,06	98,36±0,03*	87,82±0,07
	120	99,56±0,01	98,46±0,02*	85,12±0,23

Примечание - * - $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с 15 кДа.

Исследования антибактериального действия метаболитных комплексов на тест-штамм выявили наиболее активную фракцию с НОММ 15 кДа, показатель ИАА (индекс антибактериальной активности) которой находился в интервале от 95,57 до 99,56%. В результате изучения был получен материал, анализ которого позволил рекомендовать данный метод в качестве базового для определения антимикробной активности пробиотиков метаболитного типа.

Широкое использование антибактериальных препаратов приводит к селекции штаммов микроорганизмов, отличающихся повышенной устойчивостью к антибактериальным препаратам. Эффект от введения в лечебную практику антибиотиков нового поколения, как правило, не является продолжительным. Высокая активность в бактериальных системах процессов переноса генетической

информации способствует быстрому распространению антибиотикорезистентных форм микробов [41, 65, 86].

Повышение эффективности антибактериальной терапии может быть достигнуто при использовании различных факторов, увеличивающих чувствительность патогенных микроорганизмов к антибиотикам. Особенно перспективными в этом плане являются бактериальные метаболиты.

На данном этапе исследований определяли влияние УФ КЖ производственных штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1 на чувствительность *E. coli* М-17 к антибиотикам (ампициллин, гентамицин, цефалексин) и препаратам антимикробного действия (фурадонин). УФ КЖ добавляли в питательную среду в количестве 10% от ее объема. В качестве контроля в среду добавляли раствор натрия хлорида 0,9%. Результаты исследования представлены в таблице 11.

Скрининг экзометаболических фракций пробиотических бактерий штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1 позволил определить эффективность их действия в зависимости от НОММ. В ходе проведения экспериментов было установлено преобладающее антимикробное влияние на УПМ ультрафильтратов культуральных жидкостей производственных штаммов лакто- и бифидобактерий с НОММ 15 кДа.

Таблица 11 - Влияние УФ КЖ на чувствительность *E. coli* М-17 к антибиотикам и препаратам антимикробного действия

Штамм-продуцент	НОММ, кДа	Зона задержки роста <i>E. coli</i> М-17, мм			
		Ампициллин	Гентамицин	Фурадонин	Цефалексин
Контроль		24,3±0,5	15,3±0,3	13,8±0,5	18,0±0,4
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	15	24,3±0,5	16,3±0,8	14,0±1,2	20,2±1,2
	100	23,8±0,3	15,3±0,3	17,8±1,1**	22,0±0,8**
	300	24,0±0,4	16,5±0,9	15,8±0,8	20,0±0,7*

Продолжение таблицы 11

Штамм-продуцент	НОММ, кДа	Зона задержки роста <i>E. coli</i> М-17, мм			
		Ампициллин	Гентамицин	Фурадонин	Цефалексин
<i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	15	24,0±0,6	14,5±0,3	18,3±0,5**	20,0±0,8
	100	24,0±0,4	14,3±0,5	17,0±0,4**	16,5±0,5
	300	24,5±0,3	13,5±0,3**	18,8±0,8**	16,3±0,5
<i>B. bifidum</i> 1	15	24,3±0,3	12,0±0,2***	19,0±0,6**	18,5±0,3
	100	24,0±0,6	15,8±0,3	23,0±1,8**	19,3±0,5
	300	24,5±0,5	14,3±0,5	19,3±0,8**	18,5±0,9

Примечания

1. * - $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
2. ** - $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
3. *** - $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем.

Таким образом, метаболитные комплексы производственных штаммов *L. acidophilus* К₃Ш₂₄, *B. bifidum* 1 и *L. plantarum* 8Р-А3 оптимально получать на полволоконных ультрафильтрационных аппаратах с НОММ 15 и 100 кДа. УФ КЖ 15 и 100 кДа проявляют выраженную стимулирующую активность на представителей индигенной микрофлоры, а антимикробную активность по отношению к условно-патогенной микрофлоре в большей мере проявляет фракция 15 кДа.

ГЛАВА 4. ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА И ФОРМЫ ВЫПУСКА МЕТАБОЛИТНОГО МОНОПРЕПАРАТА «МИКРОСТИМ»

Используемые для изготовления пробиотических препаратов бактериальные культуры или бесклеточные культуральные жидкости, содержащие метаболиты, в нативном или регидратированном виде обладают специфическим запахом и вкусом. Особенность органолептических свойств может снижать потребительские свойства получаемых препаратов, поэтому возникает необходимость использования корригентов запаха и вкуса.

Кроме того, в процессе хранения и применения существует риск микробной контаминации метаболитных препаратов. Чтобы исключить этот негативный момент можно использовать консерванты или понизить рН метаболитного комплекса. Однако, уменьшение показателя рН ведет к увеличению кислотности и появлению кислого вкуса, что неблагоприятно для людей с желудочно-кишечными заболеваниями, сопровождающимися гиперкислотностью, а также при повышенной чувствительности зубов. Поэтому представляется более рациональным использование консервантов, в том числе доступного и широко применяемого сорбата калия.

Препарат «Микростим» на основе УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3, содержащий низкомолекулярные метаболиты лактобактерий (разработан в Пермском НПО «Биомед» в 2005 году) по своим потребительским характеристикам имеет ряд недостатков, к которым следует отнести: не оптимальную лекарственную форму (раствор во флаконах по 10 мл для наружного и внутреннего применения) и органолептические особенности (кисло-дрожжевой запах и сильносоленый вкус). В рамках данной работы было решено оптимизировать существующую рецептуру для улучшения потребительских свойств препарата с целью массового выпуска на фармацевтический рынок.

При улучшении потребительских свойств препарата следовало учитывать биологические последствия корректировки состава метабиотика. Поэтому при выборе вспомогательных веществ необходимо было изучить влияние, которое они

могут оказывать на микробиоту макроорганизма.

Для улучшения органолептических свойств апробировали вспомогательные вещества, относящиеся к группам подсластителей и ароматизаторов. Введение подсластителей увеличивает вероятность контаминации продукта, поэтому было признано необходимым дополнительное использование консервирующих веществ и регуляторов кислотности. При расчете необходимых количеств вспомогательных веществ руководствовались положениями СанПиН 2.3.2.1293-03 «Гигиенические требования по применению пищевых добавок». Варианты композиций, представленные в таблице 12, были отобраны для дальнейших исследований по приемлемым на момент изготовления физико-химическим и органолептическим показателям. Далее необходимо было исследовать стабильность модифицированных параметров метаболитных композиций и выявить возможные изменения биологической активности.

Результаты последующей серии экспериментов, включающих исследование физико-химических и биологических свойств полученных композиций, представлены в таблице 13.

Следует отметить, что диапазон органолептических параметров полученных композиций был достаточно широк. Варианты составов, включающих в себя лимонную кислоту, имели кислый вкус, который частично нивелировался при добавлении подсластителей: сахара рафинада, лактозы, фруктозы и др. Применение дисахаров в количестве 100,0 г/л в составе композиции не влияло на биохимическую активность бифидобактерий, а активность лактобактерий увеличивалась в 2 раза по сравнению с контролем. Корректировка органолептических свойств фруктозой придавала составу вкус «горелого сахара». Уменьшение концентрации сахара рафинированного до 50 г/л приводило к образованию хлопьевидного осадка, что может быть связано с созданием более благоприятных условий для бактериальной контаминации.

При замене лимонной кислоты на молочную в полученных композициях проявлялись негативные свойства: показатель рН был ниже 4,0 и появлялся неприятный вкус кислого молока.

Таблица 12 - Подбор вспомогательных веществ для УФ КЖ L. plantarum 8P-A3 15 кДа

Номер состава	Вспомогательные вещества (на 100 мл готового продукта)							
	Лимонная кислота, г	Сахар рафинад, г	Сахароза, г	Фруктоза, г	Лактоза, г	Ароматизатор «Карамель», мл	Сорбат калия, г	Раствор молочной кислоты 80%, мл
Контроль	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0,5	10,0	-	-	-	-	-	-
2	0,5	-	10,0	-	-	-	-	-
3	0,5	-	-	10,0	-	-	-	-
4	0,5	-	-	-	10,0	0,01	-	-
5	0,5	5,0	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	0,03	-
7	-	-	-	-	-	0,01	0,03	-
8	-	-	-	-	-	-	0,03	4,8
9	-	-	-	-	-	0,01	0,03	4,8
10	-	-	-	-	-	-	0,11	-
11	-	-	-	-	-	0,01	0,11	-

Таблица 13 - Физико-химические и биологические свойства вариантов состава метабιοтика

Номер состава	Описание	рН	Кислотность, °Т	КС кислотообразования	
				L. plantarum 8P-A3	B. bifidum 1
Конт-роль	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета со специфическим запахом и вкусом	6,31±0,2	52,00±0,5	1,44±0,05	1,33±0,06
1	Прозрачная жидкость без осадка сладко-кислого вкуса При хранении - осадок	4,80±0,1	100,00±0,2	2,47±0,22	0,90±0,06
2	Прозрачный раствор без осадка. Вкус кислый.	4,80±0,1	97,43±0,2	2,48±0,16	0,98±0,03
3	Темный раствор без осадка со вкусом "горелого сахара"	4,81±0,2	96,40±0,1	2,54±0,03	1,08±0,02
4	Прозрачный раствор без осадка с ароматом карамели кисло-сладкого вкуса	4,81±0,1	99,49±0,2	2,01±0,18	0,81±0,05
5	Прозрачный раствор без осадка, сладко-кислого вкуса. Хлопья в растворе	4,79±0,1	104,08±0,2	2,36±0,25	0,89±0,10
6	Прозрачный раствор без осадка, специфического запаха и вкуса.	5,74±0,1	45,00±0,1	1,62±0,16	2,3±0,25
7	Прозрачный раствор без осадка, специфического вкуса с запахом карамели.	5,83±0,2	47,00±0,2	1,39±0,15	8,00±0,82
8	Прозрачный раствор без осадка, специфического запаха и вкуса (кислого молока). Осадок в процессе хранения.	3,77±0,1	457,00±0,2	1,00±0,12	0,98±0,05
9	Прозрачный раствор без осадка, специфического запаха карамели и вкусом кислого молока. Осадок в процессе хранения	3,74±0,2	456,00±0,2	1,02±0,08	0,95±0,03
10	Прозрачный раствор со специфическим запахом и вкусом.	5,81±0,2	47,62±0,1	1,50±0,05	0,95±0,03
11	Прозрачный раствор со специфическим вкусом и запахом карамели.	5,81±0,2	47,14±0,2	1,07±0,08	0,92±0,03

Введение в составы ароматизатора способствовало маскировке неприятного запаха и изменяло вкус с сильносоленого на солоноватый.

Включение в состав композиций сорбата калия не отражалось на физико-химических и органолептических параметрах. Было установлено, что при содержании данного консерванта в количестве 0,3 г/л составы быстро подвергались контаминации (при применении в течении 5 дней при трехкратном ежедневном открывании упаковки). Увеличение концентрации консерванта до 1,1 г/л, обеспечивало более длительное сохранение микробиологической чистоты экспериментальных составов при моделировании процесса вскрытия упаковки.

По результатам подбора различных комбинаций вспомогательных веществ для улучшения состава жидкого метаболитного монопробиотика наиболее перспективным был признан вариант, включающий сорбат калия и ароматизатор карамель (экспериментальный состав №11), органолептические свойства которого характеризовались специфическим вкусом и приятным карамельным запахом.

При изучении влияния вспомогательных веществ на условно-патогенные микроорганизмы использовали билюминесцентный метод, а воздействие их на кислотообразующую способность представителей индигенной микрофлоры определяли на обедненных питательных средах. При исследовании биологических эффектов применяли разведения рассчитанных количеств вспомогательных веществ в растворе натрия хлорида 0,9%. (табл. 14 и табл. 15).

Таблица 14 - Антибактериальная активность вспомогательных веществ

ИАА, %			
Образцы вспомогательных веществ		Ароматизатор «Карамель»	Сорбат калия
Время экспозиции, мин	30	11,82±0,19	49,69±0,30
	60	28,93±0,15	45,84±0,12
	120	34,69±0,10	35,25±0,18

Результаты опыта по исследованию антибактериальной активности свидетельствуют об угнетающем воздействии растворов вспомогательных веществ в указанных концентрациях на свечение тест-штамма *E. coli lum+*. Ароматизатор «Карамель» в течении времени увеличивает значение ИАА, что связано, скорее

всего, с полиэтиленгликолем, который входит в его состав и разрушает клеточную оболочку УПМ. Согласно литературным данным сорбат калия обладает бактериостатическим эффектом в отношении бактерий (грамположительных и грамотрицательных) и грибов. Это действие связано с угнетением ферментов гликолиза – лактатдегидрогеназы и енолазы. А также с нарушением, дестабилизацией цикла лимонной кислоты. Инактивация ферментов обусловлена ковалентным связыванием сульфгидрильных групп.

Далее было проведено исследование влияние ВВ (вспомогательных веществ) на симбионтную микрофлору (табл 15).

Таблица 15 - Влияние вспомогательных веществ на активность кислотообразования лакто- и бифидобактерий

Среда культиви-рования	Тест-штамм	Контроль	Вспомогательные вещества	
			Ароматизатор карамель	Сорбат калия
Величина прироста общей кислотности, °Т				
Обрат молока	L. plantarum 8P-A3	72,79±2,92	73,57±1,56	72,77±1,13
	V. bifidum 1	62,41±1,94	57,69±1,37	56,37±2,25

При исследовании бактериотропного эффекта вспомогательных веществ наблюдалось отсутствие выраженного влияния на лакто- и бифидобактерии.

Для удобства приема потребителем пробиотического препарата было решено использовать лекарственную форму в виде капель для перорального введения. Жидкий препарат разливали во флаконы вместимостью 100 мл. Марка стекла для флакона подбиралась с учетом специфики состава и особенностей хранения метаболитного монопробиотика. Были подобраны флаконы из темного нещелочного стекла импортного производства (SGD, Франция-Германия), которые снабжались каплеобразователями и закрывались крышкой с кольцом контроля вскрытия.

Наблюдения за стабильностью нового состава проводили в течении 18

месяцев при хранении его в условиях комнатной температуры (22 ± 2) °C. Образцы для анализа отбирали в асептических условиях под ламинарным потоком воздуха. Результаты контроля представлены в таблице 16. На основании полученных данных о стабильности нового состава монокомпонентного метабиотика можно сделать заключение, что состав капель для приема внутрь стабилен в течении 18 месяце при хранении в условиях комнатной температуры.

Экспериментально было установлено, что после вскрытия флакона и в ходе применения препарата, его необходимо хранить в холодильнике при температуре (6 ± 2) °C не более 10 дней, так как использование в течение более длительного периода времени может привести к нежелательной микробной контаминации жидкого метабиотика.

На основе проведенного исследования была разработана технологическая схема (рис. 6) получения метаболитного монопробиотика «Микростим-лакто» в виде капель для перорального применения, которая учитывает все особенности препаратов данной группы: асептические условия производства, физические параметры бактериальных взвесей (вязкость, плотность), особенности введения вспомогательных веществ в ультрафильтрат культуральной жидкости. По этой технологии были получены три экспериментальные серии препарата.

При проведении технологического процесса получения оптимизированного метаболитного монопробиотика «Микростим-лакто» были определены основные контрольные точки, которые гарантируют получение высококачественного продукта (табл. 17).

Таблица 16 - Стабильность экспериментальных серий

Хранение, мес	Серия	Описание	рН	Кислотность, °Т	Стерильность		
					среда Сабуро	МПА	Солевой агар
0	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,81±0,01	47,14±0,10	-	-	-
	2		5,80±0,01	47,14±0,12	-	-	-
	3		5,68±0,01	45,26±0,10	-	-	-
6	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,77±0,01	54,72±0,12	-	-	-
	2		5,77±0,01	54,72±0,15	-	-	-
	3		5,54±0,01	56,90±0,26	-	-	-
18	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,51±0,01	78,34±0,14	-	-	-
	2		5,55±0,01	77,31±0,17	-	-	-
	3		5,56±0,02	75,48±0,23	-	-	-

Примечания

- 1 - «-» - роста на питательной среде нет;
 2 - «+» - наблюдается рост.

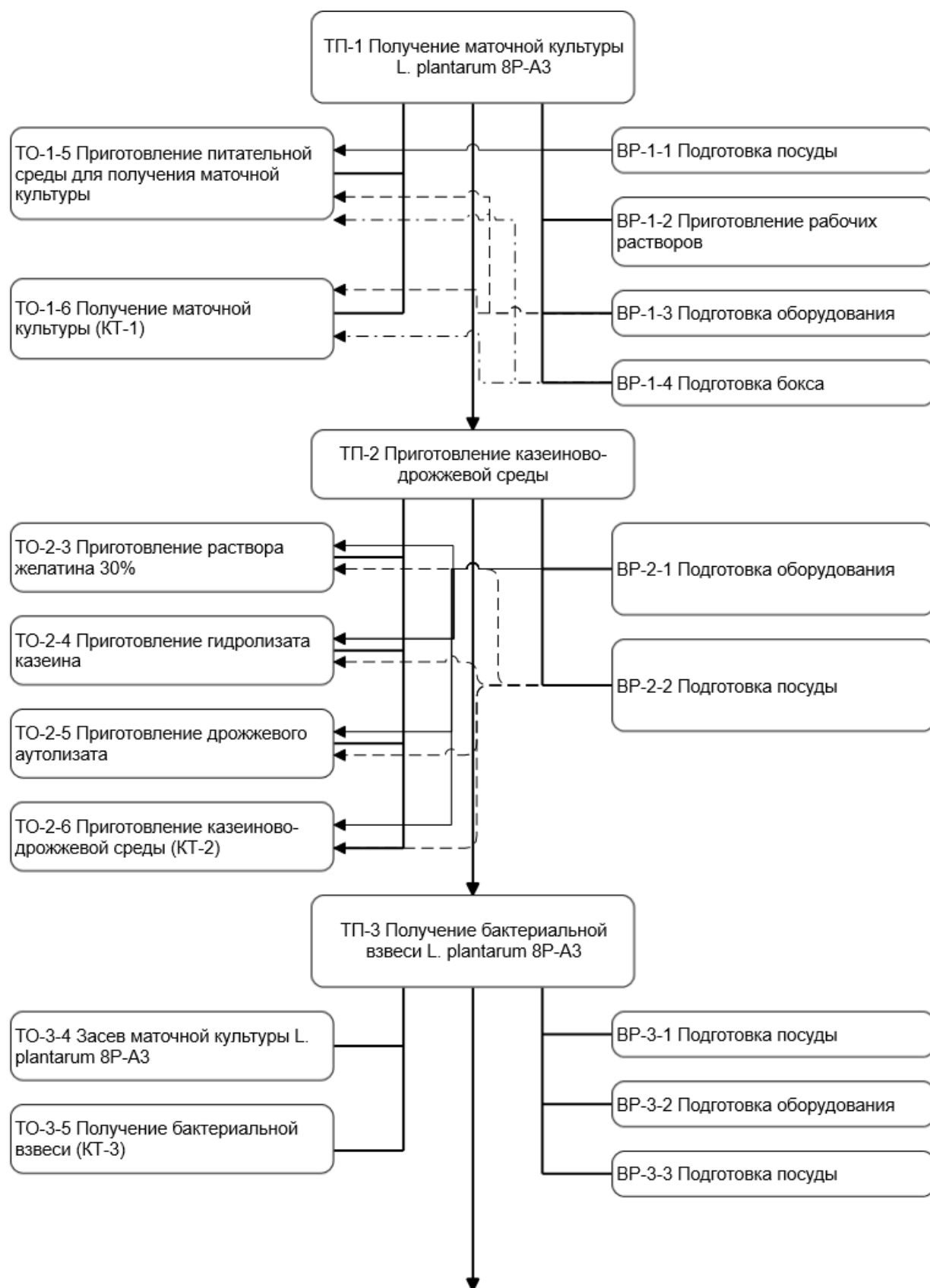


Рисунок 6 - Технологическая схема получения метаболитного монопробиотика «Микростим-лакто».

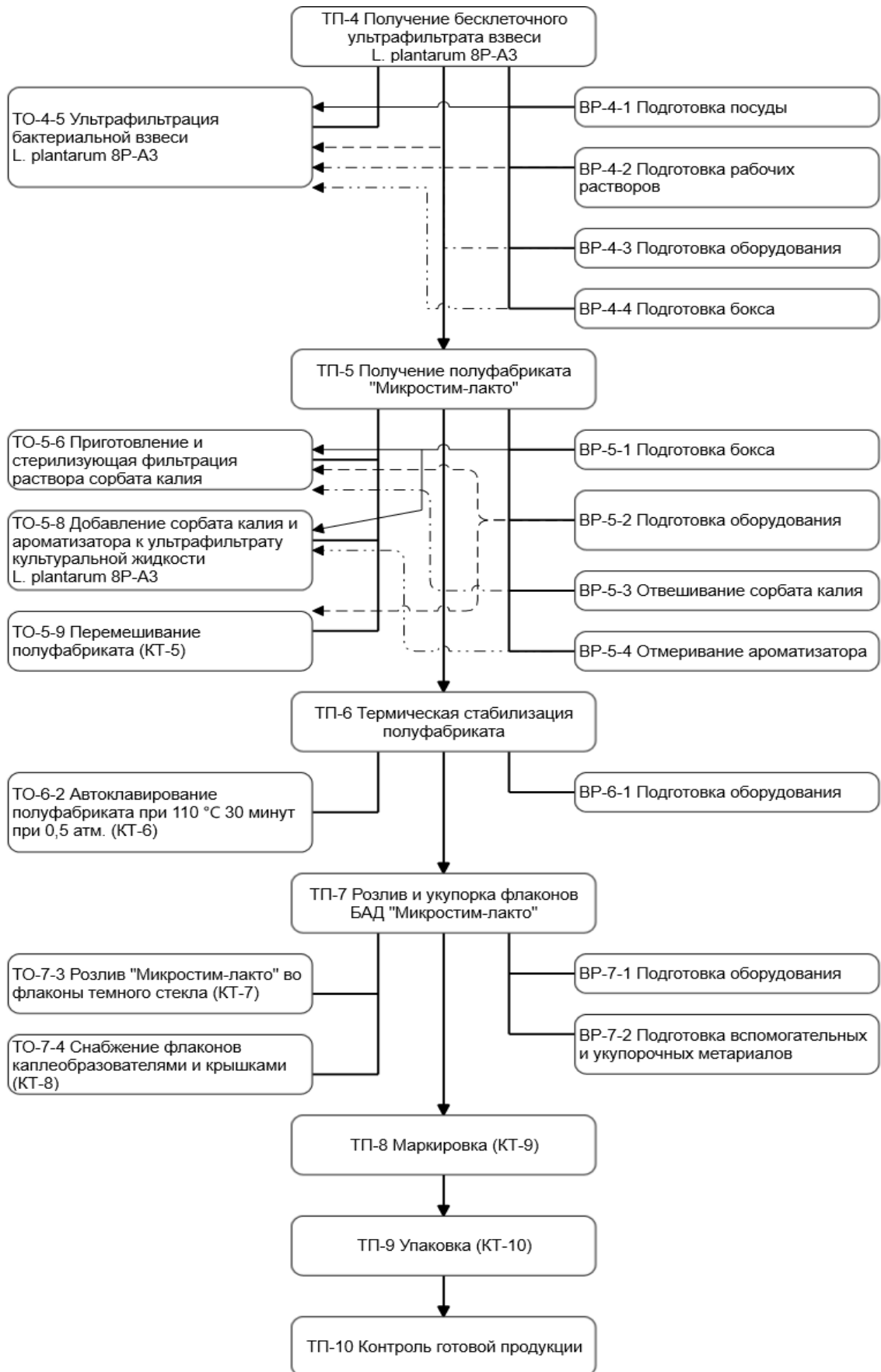


Рисунок 6 - Технологическая схема получения метаболитного монопробиотика «Микростим-лакто» (продолжение).

Таблица 17 - Перечень контрольных точек и нормируемых показателей

КТ	Наименование технологической стадии	Контролируемый показатель
КТ-1	1.6. Получение маточной культуры штамма <i>L. plantarum</i> 8P-A3,	Контроль маточных культур: не должны содержать посторонней микрофлоры и грибов.
КТ-2	2.6. Приготовление казеиново-дрожжевой среды	Контроль казеиново-дрожжевой среды: рН=(6,5±0,1); аминный азот (0,120±0,015) %, не должна содержать посторонней микрофлоры и грибов.
КТ-3	3.5 Получение бактериальной взвеси лакто- и бифидобактерий	Контроль бактериальной взвеси <i>L. plantarum</i> 8P-A3: рН=(6,4±0,4); содержание живых лактобактерий в 1 мл 10 ⁹ , не должна содержать посторонней микрофлоры и грибов.
КТ-4	4.5 Получение бесклеточного ультрафильтрата культуральной жидкости лакто- и бифидобактерий	Контроль ультрафильтрата: ультрафильтрат должен быть прозрачным.
КТ-5	5.8 Перемешивание полуфабриката	Контроль полуфабриката: рН=(5,0-6,0); кислотность не менее 40 °Т; должен быть прозрачным.
КТ-6	6.2 Автоклавирование полуфабриката при 110 °С 30 минут при 0,5 атм.	После стабилизации раствор должен оставаться прозрачным.
КТ-7	7.4. Розлив «Микростим-лакто» во флаконы из темного стекла	Объем во флаконе должен входить в нормы: ±2% [100±2] мл.
КТ-8	7.5. Снабжение флаконов каплеобразователями	Визуальный контроль внешнего вида флаконов после розлива и укупорки: отсутствие подтеков продукта на поверхности флакона, пробки не деформированы и плотно фиксированы на флаконах.
КТ-9	Маркировка	Проверка качества расположения этикетки на флаконе, контроль качества и правильности маркировки на этикетке флакона (номер партии, дата изготовления, срок годности).
КТ-10	Упаковка	

На оптимизированный состав «Микростим-лакто» был разработан проект нормативной документации, включающей технологические условия и технологическую инструкцию. Полученный метабиотик имеет характеристики, отвечающие представленным в таблице 18 требованиям, включенными в спецификацию по разработанному препарату.

Таблица 18 - Спецификация «Микростим-лакто» капли для перорального применения

Показатель	Метод	Нормы
Описание	Визуальный, органолептический	Прозрачная жидкость от светло-коричневого до желто-коричневого цвета со специфическим вкусом и слабым ароматом карамели
Подлинность	СФМ Колориметрический ГФ XII, вып.1, с. 111	УФ-спектр препарата должен иметь максимум поглощения при 260 ± 5 нм и минимум поглощения при 235 ± 5 нм. Белкового азота не менее 0,2 мг/мл
Прозрачность	ГФ XII, вып 1, с. 98	Препарат должен быть прозрачным
pH	Потенциометрический ГФ XII, вып.1, с.89	От 5,0 до 6,5
Плотность	ГФ XII, вып 1, с. 40, метод 3	1,010 – 1,020 г/мл
Номинальный объем	ГФ XI, вып 2, с. 140	Отклонение номинального объема не должно превышать 2%
Герметизация	МУК 4.1/4.2.588-96, с. 64	Препарат должен быть герметичен
Стерильность	Метод прямого посева по МУК 4.1/4.2.588-96, с. 25	Препарат должен быть стерильным
Безвредность	Биологический	Препарат должен быть безвредным
Специфическая активность	Биолюминесценция	Цельный препарат должен подавлять свечение люминесцентного штамма <i>E. coli</i> не менее чем на 95% через 30 мин совместной экспозиции
Упаковка		100 мл во флаконе. 1 флакон с инструкцией по применению в картонной пачке

Продолжение таблицы 18

Показатель	Метод	Нормы
Транспортирование		При температуре не выше 25 °С
Хранение		В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С
Срок годности		2 года

Оптимизированный состав метаболитного монопробиотика «Микростим-лакто», по отзывам потенциальных потребителей, обладает удобной лекарственной формой (капли для внутреннего и наружного применения в оптимальной объемной упаковке) и приятными органолептическими характеристиками, сочетающими аромат карамели и слабосоленый вкус.

Результаты работы по оптимизации состава препарата позволяют выделить оптимальные вспомогательные вещества, которые можно применить для коррекции органолептических свойств метабиотиков, получаемых с использованием казеиново-дрожжевых сред. Данные вспомогательные вещества, вводимые в указанных концентрациях, не оказывают негативного влияния на эффективность препарата и микробиоценоз макроорганизма.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО МЕТАБИОТИКА «ХИЛАБИКС»

Методические и технологические подходы, которые применяли для усовершенствования состава и формы выпуска монокомпонентного метабиотика «Микростим-лакто», легли в основу разработки комплексного метаболитного пробиотика, получившего название «Хилабикс».

При конструировании метаболитной композиции комплексного пробиотика было решено использовать КЖ производственных штаммов лакто- и бифидобактерий (*L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1), которые длительное время применяются практическим здравоохранением и показали свою положительную роль как пробиотические агенты [9, 25, 43].

Качественное и количественное соотношение метаболитов выбрано с учетом совместимости и влияния штаммов-продуцентов на микробиоту разных биотопов макроорганизма, а также их антагонистической активности по отношению к представителям УПМ. Из указанных производственных штаммов наиболее активен *L. plantarum* 8P-A3, поэтому его метаболиты преобладают (50%) в общем составе композиции. Основную часть микрофлоры влагалища представляют ацидофильные лактобактерии, которые продуцируют лизоцим и закисляют секрет слизистой. Бифидобактерии являются основой формирования микрофлоры ЖКТ. Экзометаболитные фракции штаммов *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1 бактерий составляют по 25% от общего объема. Такое соотношение метаболитов направлено на обеспечение высокой клинической эффективности пробиотической композиции и широкой сферы её применения.

В результате предварительных исследований активности метаболитных фракций было предложено два варианта композиции, включающей смесь экзометаболитов трех пробиотических штаммов и корректирующие органолептику добавки и вещества, необходимые для стабильности препарата при хранении:

Хилабикс 15: УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 (15 кДа) - 2 части

УФ КЖ L. acidophilus К₃Ш₂₄ (15 кДа) - 1 часть

УФ КЖ В. bifidum 1 (15 кДа) - 1 часть

Раствор сорбата калия 30% - 3,6 мл/л

Ароматизатор карамель и.н. - 0,1 мл/л

Хилабикс 100: УФ КЖ L. plantarum 8P-A3 (100 кДа) - 2 части

УФ КЖ L. acidophilus К₃Ш₂₄ (100 кДа) - 1 часть

УФ КЖ В. bifidum 1 (100 кДа) - 1 часть

Раствор сорбата калия 30% - 3,6 мл/л

Ароматизатор карамель и.н. - 0,1 мл/л

5.1 Физико-химические показатели и биологическая активность комплексного метабиотика

Одним из начальных этапов разработки комплексного метаболитного пробиотика было исследование физико-химических и биологических свойств экспериментальных композиций с последующим выбором варианта, который может оказывать более выраженное действие на макроорганизм. Физико-химические и биологические показатели вариантов метабиотика представлены в таблицах 19 — 23.

Таблица 19 - Физико-химические показатели вариантов комплексного метабиотика

Показатель	Хилабикс 15	Хилабикс 100
Внешний вид	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета со слабым запахом карамели и специфическим вкусом.	
pH	5,50±0,50	5,80±0,30
Кислотность, °Т	56,02±2,01	74,74±1,34
Сухой остаток, г/мл	0,0463±0,0069	0,0568±0,0073

Продолжения таблицы 19

Показатель	Хилабикс 15	Хилабикс 100
Общий азот, мг/мл	3,5±0,2	3,9±0,1
Аминный азот, %	0,64±0,04	0,65±0,05
Белковый азот, мг/мл	0,19±0,04	0,21±0,03
Белок, мг/мл	1,17±0,03	1,33±0,04
Плотность, г/см ³	1,012±0,002	1,013±0,001
Вязкость, мПа*с	1,1340±0,0024	1,2568±0,0031

Показатели рН, сухого остатка, аминного азота и плотности в экспериментальных образцах не обладали достоверными различиями, а показатели кислотности, общего азота и вязкости имели существенные отличия, обусловленные спецификой метаболитных фракций, получаемых на разделительных аппаратах с различной отсекаемой способностью по молекулярной массе.

При сравнительном изучении ультрафиолетовых спектров (табл. 20) составов наблюдалась аналогия со спектрами моноультрафильтратов культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий, представленных в главе 3. Это позволило сделать заключение об идентичности аминокислотной составляющей, которая представлена такими аминокислотами как тирозин и фенилаланин. Кроме того, исследование ультрафиолетового спектра композиций подтверждает однородность исходного сырья, используемого при получении питательных сред для культивирования продуцентов метаболитов.

Наличие отличий физико-химических показателей составов Хилабикс 15 и Хилабикс 100 позволило предположить их различную биологическую активность, что требовалось подтвердить при проведении дальнейшего исследования, направленного на изучение воздействия метаболитных комплексов на представителей нормальной и условно-патогенной микрофлоры.

Таблица 20 - УФ спектры образцов

Штамм-производитель	Длина волны, нм	
	Max	Min
Хилабикс 15	258,2	232,3
Хилабикс 100	255,7	235,3

Таблица 21 - Влияние метаболитов на рост лакто- и бифидобактерий (раствор глюкозы 0,5%)

Образец	Прирост оптической плотности, $D_{540 \text{ нм}}$	
	Контроль	Опыт
Тест-штамм <i>L. plantarum</i> 8P-A3		
Хилабикс 15	0,250±0,02	0,740±0,05*
Хилабикс 100		0,710±0,07*
Тест-штамм <i>B. bifidum</i> 1		
Хилабикс 15	0,161±0,08	0,192±0,10
Хилабикс 100		0,213±0,09

Примечание - * - $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем.

Результаты, представленные в таблице 21, свидетельствуют о почти трехкратном увеличении прироста оптической плотности культуры лактобактерий в опыте по сравнению с контролем. Влияние на бифидобактерии менее выражено, но в целом оба препарата характеризуются наличием активности, направленной на увеличение накопления биомассы микроорганизмов, относящихся к нормофлоре.

При сравнительном исследовании эффекта, оказываемого метаболитными композициями на тест-штаммы (*L. plantarum* 8P-A3 и *B. bifidum* 1), было установлено, что на кислотообразующую активность лактобактерий в большей степени влияет Хилабикс 15, а бифидобактерий – Хилабикс 100.

Таблица 22 - Влияние препаратов на активность кислотообразования лакто- и бифидобактерий

Образец	Прирост общей кислотности, °Т			
	Обрат молока		Раствор глюкозы 0,5%	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Тест-штамм <i>L. plantarum</i> 8P-A3				
Хилабикс 15	77,43±2,81	93,89±1,11*	22,46±0,36	44,91±1,45*
Хилабикс 100	77,43±2,81	87,48±0,69*/**	22,46±0,36	36,62±2,86**
Тест-штамм <i>B. bifidum</i> 1				
Хилабикс 15	46,69±4,54	75,88±2,11*	2,87±0,61	4,42±0,68**
Хилабикс 100		73,55±2,35*		8,16±0,14

Примечание:

- * - $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
- ** - $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с препаратом 15.

Анализ данных, представленных в таблице 22, позволяет сделать вывод, что оба состава комплексного метабиотика «Хилабикс» значительно стимулируют кислотообразование тест-штаммов *L. plantarum* 8P-A3 и *B. bifidum* 1 как модельных представителей нормобиоценоза макроорганизма, что подтверждает вероятность выраженного эффекта воздействия на колонизационные свойства микробиоты и колонизационную резистентность соответствующих биотопов ЖКТ.

Дальнейшим исследованием свойств метаболитных композиций было установление уровня антимикробной активности в отношении УПМ с целью определения показаний к применению метабиотика. В качестве препарата сравнения был выбран зарубежный комплексный метабиотик «Хилак-форте» (Ратиофарм, Германия). Для корректного сопоставления эффектов довели рН аналога до 5,5-6,0 раствором натрия гидроксида 20% (избегали разбавления образца водой) и использовали параллельно с вариантами состава нового пробиотика в тесте ингибирования биOLUMиНесценции. Добавление гидроксида

натрия приводило к увеличению рН и частичной нейтрализации синтетической молочной кислоты, содержание которой в контрольном препарате превалирует над метаболитными комплексами бактериальных штаммов.

Таблица 23 - Антибактериальная активность метабиотиков

Ингибирование биолюминесценции тест-штамма (ИАА), %				
		Хилабикс 15	Хилабикс 100	«Хилак-форте»
Нативный				
Время экспозиции, мин	5	99,80±0,19	98,99±0,34	99,96±0,11
	60	99,96±0,20	99,53±0,18	99,99±0,25
	120	99,97±0,10	99,67±0,16	99,98±0,23
Разведенный в 5 раз				
Время экспозиции, мин	5	94,46±0,40	73,36±3,21	89,08±0,14
	60	94,71±0,24	64,21±7,95	88,30±0,15
	120	90,52±3,48	63,83±6,88	87,11±0,12
Разведенный в 10 раз				
Время экспозиции, мин	5	77,36±2,26***	67,04±6,24*	49,55±0,13
	60	72,86±0,86***	54,15±8,40	50,23±0,17
	120	61,68±5,71**	50,27±5,79*	33,06±0,16

Примечание:

1. ***- $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента в сравнении с «Хилак форте»;
2. **- $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента в сравнении с «Хилак форте»;
3. *- $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента в сравнении с «Хилак форте».

Оба метаболитных пробиотика обладают угнетающим действием на энтеробактерии *E. coli lum+*. Цельные препараты быстро и значительно (более чем на 98%) ингибируют биолюминесценцию тест-штамма. Разведение метабиотиков в 10 раз позволило выявить достоверные отличия их антибактериальной активности. При равных значениях рН (5,8±0,1) «Хилабикс» в большей степени угнетает

свечение *E. coli lum+* по сравнению с препаратом «Хилак форте».

Следующим этапом исследования биологических свойств Хилабикс было определение степени его влияния на активность антибактериальных препаратов при их совместном применении для лечения кишечных инфекции или коррекции дисбиоза.

Таблица 24 - Влияние «Хилабикс» на чувствительность *E. coli* М-17 к антибиотикам и препаратам антимикробного действия

Образец	Зона подавления роста тест-штамма, мм			
	Ампициллин	Гентамицин	Фурадонин	Цефалексин
Контроль	24,3±0,5	15,3±0,3	13,8±0,5	18,0±0,4
Хилабикс 15	25,3±0,3	15,3±0,5	15,5±0,5*	15,8±0,8*
Хилабикс 100	24,3±0,5	15,8±0,8	21,5±0,9**/#	21,8±0,8**/#

Примечания

1. * - $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента в сравнении с контролем;
2. ** - $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента в сравнении с контролем;
3. # - $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента в сравнении с Хилабикс 15.

Данные эксперимента по исследованию комплексной антимикробной активности при совместном применении метабиотика с антибактериальным средством позволяют сделать вывод, что Хилабикс 15 и Хилабикс 100 повышают чувствительность *E. coli* к фурадонину и цефалексину. Более выраженный эффект при этом проявляет Хилабикс 100.

5.2 Технология получения комплексного метаболитного пробиотика

«Хилабикс»

Анализ ассортимента рынка пробиотиков и пожелания потенциальных потребителей позволили определить оптимальную лекарственную форму для состава «Микростим-лакто» (с учетом исследования стабильности состава).

Основываясь на принципах удобства применения для конечного потребителя и сохранения качества продукта в процессе хранения для состава «Хилабикс» была выбрана лекарственная форма в виде капель для перорального применения. Препарат представляет собой жидкость во флаконах вместимостью 100 мл из темного нещелочного стекла импортного производства (SGD, Франция-Германия), которые снабжаются каплеобразователями и закрываются крышкой с кольцом контроля вскрытия.

Технология получения жидкого метаболитного пробиотика «Хилабикс» была разработана с учетом всех особенностей выбранных штаммов–продуцентов и специфики экзометаболитного комплекса.

Производство жидких метаболитных пробиотиков связано с выполнением основных технологических стадий, включающих: выделение экзометаболитного комплекса, его стабилизацию и розлив. На каждой из этих стадий необходимо соблюдать асептические условия, так как возможна контаминация продукта посторонней микрофлорой, что является недопустимым.

Бактериальные взвеси перед процедурой ультрафильтрации нужно выдерживать в термостате при температуре (5 ± 3) °C для сохранения максимального количества жизнеспособных клеток, которые после частичного удаления метаболитов могут быть использованы для производства бактериальных (клеточных) пробиотиков. Данная технология встраивается в производственный процесс получения классических пробиотиков на конечном этапе получения бактериальных взвесей.

Операция выделения экзометаболитных фракций сопровождается одновременным концентрированием бактериальных культур, содержащих живые клетки, которые используются в последующих операциях (лиофилизация, приготовление лекарственных форм) по получению бактериальных препаратов (лактобактерин, бифидумбактерин, ацилакт и др.)

Особенностью разработанной технологии является то, что она представляет собой составную часть комплексного способа получения целого ряда пробиотических препаратов, отличающихся по наличию (отсутствию) живых клеток.

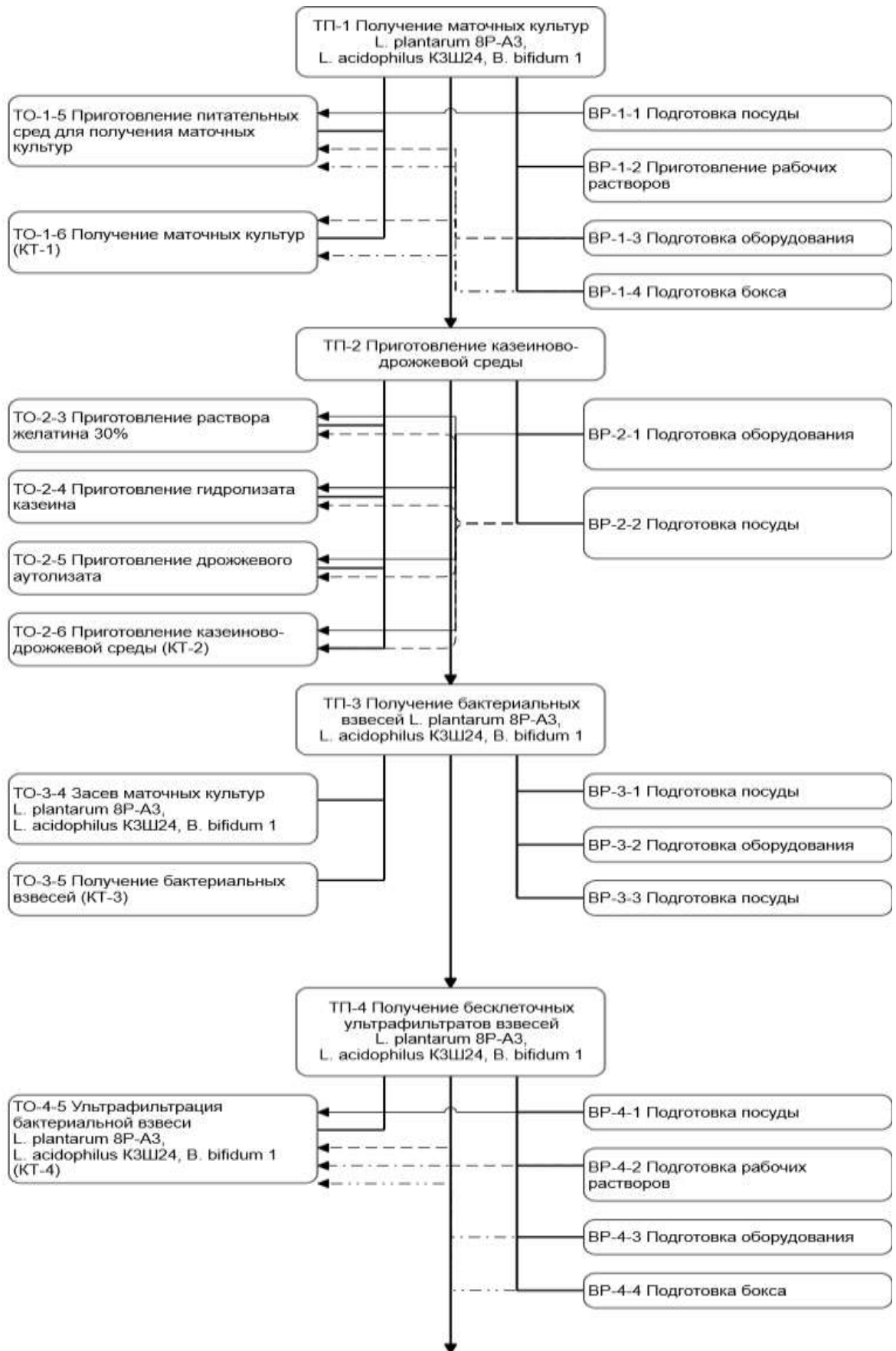


Рисунок 7 – Технологическая схема получения комплексного метабиотика «Хилабикс»

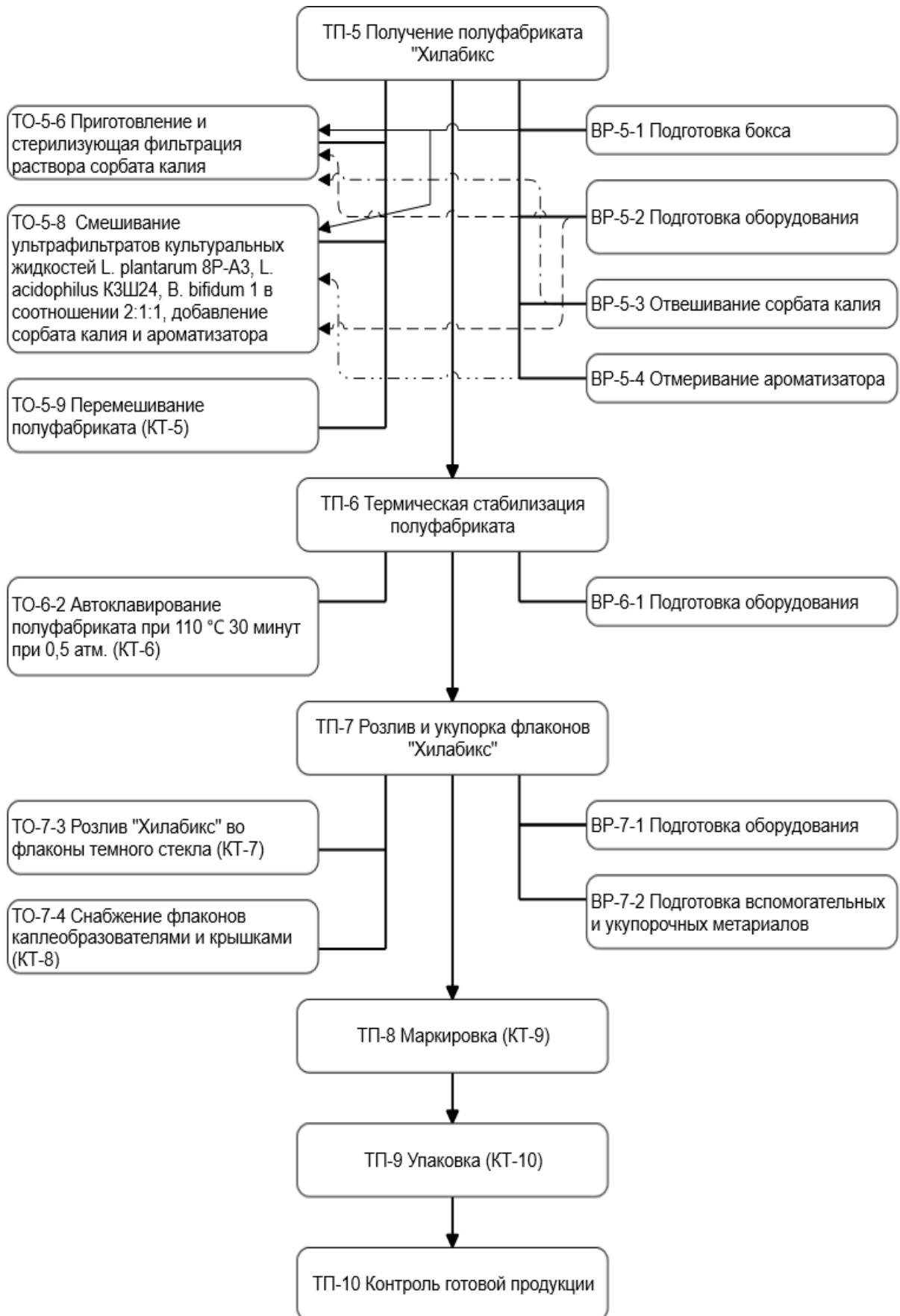


Рисунок 7 – Технологическая схема получения комплексного метабіотика «Хилабикс» (продолжение)

Процесс производства комплексного метабиотика включает 10 основных стадий:

1 стадия – Получение маточных культур лакто- и бифидобактерий штаммов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1.

2 стадия – Приготовление казеиново-дрожжевой среды.

3 стадия – Получение бактериальных взвесей лакто- и бифидобактерий.

4 стадия – Получение бесклеточного ультрафильтрата культуральной жидкости лакто- и бифидобактерий.

5 стадия – Получение полуфабриката комплексного метабиотика.

6 стадия – Стабилизация полуфабриката термической обработкой.

7 стадия – Розлив комплексного метабиотика во флаконы-капельницы и их укупорка.

8 стадия – Маркировка.

9 стадия – Упаковка.

10 стадия – Контроль готовой продукции.

ТП 1. Получение маточных культур лакто- и бифидобактерий штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1

Маточную культуру каждого производственного штамма получают в отдельных помещениях, чтобы исключить перекрестную контаминацию. Каждое помещение должно быть оборудовано холодильником, в котором хранятся лиофилизированные культуры производственных штаммов.

В асептических условиях (в боксе) вскрывают флакон с лиофилизированной культурой производственного штамма и проводят ряд последовательных пассажей с использованием регламентированных питательных сред. Посевы (в пробирках, на чашках Петри, во флаконах и бутылках) инкубируют в термостате при температуре (37±1) °С – для *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и (38±1) °С – для *B. bifidum* 1. Маточную культуру контролируют в производственном подразделении на отсутствие посторонней микрофлоры (КТ-1).

ТП 2. Приготовление казеиново-дрожжевой среды.

В предварительно подготовленный реактор наливают необходимое

количество воды очищенной, гидролизата казеина и дрожжевого аутолизата, кипятят в течение (15 ± 2) мин. Затем вносят в реактор расчетное количество 30% раствора желатина, раствор солей и *L*-цистеин. Содержимое реактора перемешивают и стерилизуют термическим методом путем подачи пара в паровую рубашку. Стерильную питательную среду по специальному трубопроводу передают в реактор-культиватор.

ТП 3. Получение бактериальной взвеси лактобактерий.

В реактор-культиватор (отдельный для каждого штамма) с казеиново-дрожжевой средой с соблюдением требований асептики проводят засев предварительно полученной маточной культуры. Параметры культивирования соблюдают в зависимости от ростовых свойств производственного штамма (см. главу 3).

Бактериальную взвесь контролируют по следующим показателям: рН, количество живых бактерий, отсутствие посторонней микрофлоры (КТ-3).

ТП 4. Получение УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К3Ш₂₄ и *B. bifidum* 1.

ВР-4-1. Подготовка оборудования.

Подготовка оборудования проводится согласно нормативной документации, прилагаемой вместе с АР.

Перед использованием АР необходимо удостовериться в целостности волокна. Целостность полых волокон является важнейшим фактором для работы ультрафильтрационной установки, необходимо полное отделение клеточной биомассы от культуральной жидкости.

ТО-4-5. Ультрафильтрация бактериальных взвесей.

В ходе процесса ультрафильтрации получают УФ КЖ и концентрат бактериальной взвеси, который используют для получения других лекарственных форм пробиотиков.

Метаболитные комплексы выделяли из КЖ на установке УПЛ-0,6 при давлении 0,1 Мпа.

Контролируют полученный УФ КЖ по показателю прозрачность.

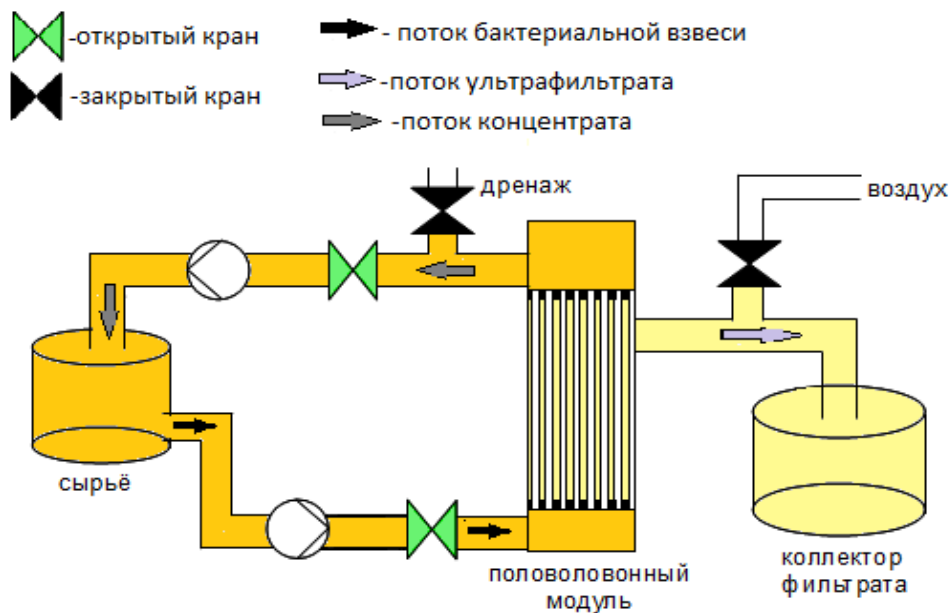


Рисунок 8 – Схема ультрафильтрации бактериальных взвесей.

ТП 5. Получение полуфабриката комплексного метабьотика.

Полученные УФ КЖ смешивают в соотношении 2:1:1 (см. составы Хилабикс) в стерильной емкости или реакторе вместимостью 50-100 л. Вносят необходимое количество вспомогательных веществ из расчета 1,0 г/л сорбата калия и 0,1 мл/л ароматизатора карамель.

Полуфабрикат контролируют по показателю прозрачность, рН.

ТП 6. Термическая стабилизация полуфабриката.

ТО-6-2. Автоклавирование полуфабриката.

Автоклавирование полуфабриката проводят с целью его стабилизации, повышения специфической активности и устойчивости при хранении в условиях комнатной температуры. Процесс проводят в течении 30 мин при температуре 110 °С и давлении 0,5 атм.

После автоклавирования проводят контроль по показателям: рН, кислотность, стерильность, прозрачность.

ТП 7. Розлив комплексного пробиотика.

Операцию по розливу проводят под ламинарным потоком воздуха во флаконы темного стекла, которые снабжают каплеобразователями и закрывают крышками с кольцом контроля вскрытия.

В процессе работы проводят визуальный контроль внешнего вида флаконов, качества укупорки и номинального объема флакона (отсутствие подтеков продукта на поверхности флакона, отсутствие деформации пробок и их плотную фиксацию на флаконах).

ТП 8. Маркировка.

Маркировка потребительской упаковочной единицы 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.

В процессе работы контролируют качество и правильность маркировки на этикетке.

ТП 9. Упаковка.

Флаконы с готовым препаратом укладывают по 1 штуке в пачки, изготовленные из картона для потребительской тары. Пачки должны быть упакованы в ящики из гофрокартона.

В процессе упаковки флаконов в картонные пачки проводят проверку качества расположения этикетки, правильность и наличие маркировки (номер партии, дата изготовления, срок годности).

Для получения качественного продукта на всех технологических стадиях предусмотрены контрольные точки, которые представлены в таблице 25.

Таблица 25 - Перечень контрольных точек и нормируемых показателей

КТ	Наименование этапа	Контролируемый показатель
КТ-1	2.4. Получение маточных культур штаммов <i>L. plantarum</i> 8P-A3, <i>B. bifidum</i> 1, <i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	Не должны содержать посторонней микрофлоры и грибов.
КТ-2	2.6. Приготовление казеиново-дрожжевой среды	pH=(6,5±0,1); аминный азот (0,120±0,015) %, не должна содержать посторонней микрофлоры и грибов.
КТ-3	3.5 Получение бактериальной взвеси лакто- и бифидобактерий	Взвесь <i>L. plantarum</i> 8P-A3: pH=(6,4±0,4); содержание живых лактобактерий в 1 мл 10 ⁹ , не должна содержать посторонней микрофлоры и грибов. Взвесь <i>L. acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄ : pH=(6,4±0,4); содержание живых лактобактерий в 1 мл не 10 ⁹ ; не должна содержать посторонней микрофлоры и грибов. Взвесь <i>B. bifidum</i> 1: pH=(5,5±0,5); содержание живых лактобактерий в 1 мл не менее 10 ⁹ ; не должна содержать посторонней микрофлоры и грибов.
КТ-4	4.5 Получение бесклеточного ультрафильтрата культуральной жидкости лакто- и бифидобактерий	Ультрафильтрат должен быть прозрачным.
КТ-5	5.8 Получение полуфабриката	pH=(5,0-6,0); кислотность не менее 40 °Т; должен быть прозрачным.

Продолжение таблицы 25

КТ	Наименование этапа	Контролируемый показатель
КТ-6	6.2 Стабилизация термической обработкой полуфабриката	После стабилизации раствор должен оставаться прозрачным.
КТ-7	Розлив во флаконы-капельницы метабиотика, укупорка флаконов пробками	Объем во флаконе должен входить в нормы: $\pm 2\%$ [100 \pm 2] мл.
КТ-8	Розлив во флаконы-капельницы, укупорка флаконов пробками	Визуальный контроль внешнего вида флаконов после розлива и укупорки: отсутствие подтеков продукта на поверхности флакона, пробки не деформированы и плотно фиксированы на флаконах.
КТ-9	Маркировка	Проверка качества расположения этикетки на флаконе, контроль качества и правильности маркировки на этикетке флакона (номер партии, дата изготовления, срок годности).
КТ-10	Упаковка	Правильность и соответствие маркировки на флаконе и пачке (номер партии, дата изготовления, срок годности).
КТ-11	Контроль готовой продукции	Показатели: - органолептические свойства; - рН=(5,0 - 6,0); - плотность: 1,010 – 1,020 г/см ³ ; - подлинность (УФ-спектр поглощения) и количество белкового азота не менее 0,1 мг/мл; - кислотность: не менее 40 °Т; - отсутствие лакто- и бифидобактерий - микробиологическая чистота.

По разработанной технологии было получено три экспериментально-производственные серии «Хилабикс 15» и «Хилабикс 100» для последующего исследования их стабильности в процессе хранения.

Полученные серии препарата соответствовали требованиям разработанной спецификации, представленной в таблице 26.

Таблица 26 - Спецификация «Хилабикс» капли для перорального применения

Показатель	Метод	Нормы
Описание	Визуальный, органолептический	Прозрачная жидкость от коричневого до темно-коричневого цвета со специфическим вкусом и слабым ароматом карамели.
Подлинность	СФМ Колориметрический ГФ XII, вып.1, с. 111	УФ-спектр препарата должен иметь максимум поглощения при 259 ± 5 нм («Хилабикс 15»), 260 ± 5 нм («Хилабикс 100») и минимум поглощения при 230 ± 5 нм («Хилабикс 15») и 235 ± 5 нм («Хилабикс 100») Белкового азота не менее $0,2\pm 0,1$ мг/мл
Прозрачность	ГФ XII, вып 1, с. 98	Препарат должен быть прозрачным
pH	Потенциометрический ГФ XII, вып.1, с.89	От 5,0 до 6,0
Плотность	ГФ XII, вып 1, с. 40	1,010 – 1,020 г/мл
Номинальный объем	ГФ XI, вып 2, с. 140	Отклонение номинального объема не должно превышать 2%
Герметизация	МУК 4.1/4.2.588-96, с. 64	Препарат должен быть герметичен
Стерильность	Метод прямого посева по МУК 4.1/4.2.588-96, с. 25	Препарат должен быть стерильным
Безвредность	Биологический	Препарат должен быть безвредным
Специфическая активность	Билюминесцентный	Цельный препарат должен подавлять свечение люминесцентного штамма <i>E. coli</i> не менее чем на 95% через 30 минут совместной экспозиции

Продолжение таблицы 26

Показатель	Метод	Нормы
Упаковка		100 мл во флаконе. 1 флакон с инструкцией по применению в картонной пачке
Транспортирование		При температуре не выше 25 °С
Хранение		В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С
Срок годности		1 год

Наблюдения за стабильностью составов «Хилабикс» (капли для перорального применения) проводили в течении 18 месяцев при хранении в условиях комнатной температуры (табл. 27 и 28). Отбор образцов для периодического контроля проводили в асептических условиях. Результаты контроля позволили сделать заключение о стабильности «Хилабикс 15» и «Хилабикс 100» при хранении в течении 18 месяцев при комнатной температуре (15-25) °С.

Экспериментально было установлено, что после вскрытия флакона и в ходе применения препарата «Хилабикс» его необходимо хранить в условиях бытового холодильника (не выше 8 °С) не более 10 дней (аналогично «Микростим-лакто»).

Таблица 27 - Стабильность экспериментальных серий «Хилабикс 15»

Хранение, мес	№ серии	Описание	рН	Кислотность, °Т	Стерильность*		
					среда Сабуро	МПА	Солевой агар
0	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,56±0,01	52,00±0,10	-	-	-
	2		5,51±0,01	57,23±0,34	-	-	-
	3		5,55±0,01	54,30±0,15	-	-	-
6	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,56±0,01	74,53±0,10	-	-	-
	2		5,60±0,10	75,22±0,34	-	-	-
	3		5,57±0,01	74,34±0,26	-	-	-
18	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,25±0,01	57,73±0,14	-	-	-
	2		5,61±0,01	68,03±0,17	-	-	-
	3		5,57±0,02	65,15±0,18	-	-	-

Примечание: * - роста на питательной среде нет; «+» - наблюдается рост.

Таблица 28 - Стабильность экспериментальных серий «Хилабикс 100»

Хранение, мес	№ серии	Описание	рН	Кислотность, °Т	Стерильность		
					среда Сабуро	МПА	Солевой агар
0	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,91±0,01	47,44±0,12	-	-	-
	2		5,83±0,01	49,48±0,10	-	-	-
	3		5,82±0,01	49,20±0,10	-	-	-
6	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,81±0,01	61,85±0,15	-	-	-
	2		5,74±0,01	64,95±0,10	-	-	-
	3		5,70±0,01	63,37±0,16	-	-	-
18	1	Прозрачный раствор со специфическим солоноватым вкусом и запахом карамели	5,81±0,01	56,70±0,10	-	-	-
	2		5,58±0,01	53,61±0,13	-	-	-
	3		5,56±0,02	55,48±0,20	-	-	-

Примечание:

1. «-»- роста на питательной среде нет;
2. «+» - наблюдается рост.

Разработанная технология по получению метаболитных пробиотиков является универсальной и может быть применена для выделения активной экзометаболитной фракции любого производственного пробиотического штамма.

Разработан метаболитный пробиотик «Хилабикс», обладающий выраженной пробиотической и доказанной антибактериальной активностью, позволяющих расширить линейку препаратов для коррекции дисбиотических нарушений и пополнить арсенал отечественных пробиотиков, не уступающих по совокупности потребительских свойств зарубежным препаратам.

По результатам доклинического исследования составов Хилабикс 15 и Хилабикс 100 будет принято решение по выбору наиболее эффективной композиции.

ВЫВОДЫ

1. Установлены оптимальные условия разделения культуральных жидкостей на бактериальные концентраты и высокоактивные фракции (ультрафильтраты) с использованием разделительных аппаратов с НОММ в диапазоне 15 – 100 кДа.

2. Все исследуемые образцы метаболитных фракций обладают биологической активностью. Выявлена зависимость между отсекающей характеристикой разделительного аппарата и степенью выраженности биологической активности получаемой метаболитной фракции. По совокупности исследуемых параметров лучшие показатели антимикробной активности обнаружены у ультрафильтратов, полученных с использованием разделительных аппаратов с номинальной отсекаемой молекулярной массой 15 кДа, а более выраженная пробиотическая активность наблюдалась у ультрафильтрата культуральной жидкости *L. plantarum* 8P-A3 и *L. acidophilus* КЗШ24 - 100 кДа.

3. Усовершенствован состав и оптимизирована лекарственная форма метаболитного монопробиотика «Микростим». Органолептические свойства улучшены за счет добавления сорбата калия и ароматизатора карамель. Разработана технологическая схема производства модернизированного препарата «Микростим-лакто капли для наружного и внутреннего применения» во флаконах-капельницах по 100 мл.

4. Разработан состав и технология получения комплексного метаболитного пробиотика «Хилабикс» на основе ультрафильтратов культуральных жидкостей производственных штаммов бактерий: *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* КЗШ24 и *B. bifidum* 1. Доказано пробиотическое действие «Хилабикс» на представителей симбионтной микрофлоры, характеризующееся эффектом стимуляции роста и активности кислотообразования клеток. По антагонистической активности в отношении условно-патогенных бактерий, разработанный препарат «Хилабикс» обладает более выраженным действием по сравнению с импортным аналогом «Хилак форте».

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авторский синбиотик с антимикробной активностью: основные биологические свойства, эффективность применения / И. В. Белова [и др.] // Мед. альм. – 2011. – № 4 (17). – С. 84–88.
2. Адгезия лактобактерий к клеткам вагинального и буккального эпителия / А. Г. Бойцов [и др.] // Вестн. Санкт-Петербург. мед. акад. им. И. И. Мечникова. – 2004. – № 4 (5) – С. 191–193.
3. Алешкин, А. В. Поликомпонентные пробиотические препараты – конструирование, производство и стратегия их продвижения на Российском фармацевтическом рынке : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / А. В. Алешкин. – Москва, 2010. – 47 с.
4. Асташкина, А. П. Современные взгляды на биологическую роль бифидо- и лактобактерий // Вестн. ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2010. – № 1. – С. 133–139.
5. Бабаян, М. Л. Применение пробиотиков метаболитного типа в коррекции дисбиотических нарушений кишечника у детей // Дет. гастроэнтерология. – 2005. – № 2. – С. 14–16.
6. Бактериоциноподобные вещества и локализация генов, контролирующих их синтез, у новых кандидатов в пробиотики / Е. С. Дорофеева [и др.] // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания: фундаментальные и клинические аспекты : материалы 9 Междунар. Славяно-Балт. науч. форума «Санкт-Петербург ГАСТРО-2007», Санкт-Петербург, 16–19 мая 2007. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 38.
7. Бактериоцины и бактериоциноподобные вещества как биологически активные средства / Л. П. Блинкова [и др.] // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания: фундаментальные и клинические аспекты : материалы 9 Междунар. Славяно-Балт. науч. форума «Санкт-Петербург ГАСТРО-2007», Санкт-Петербург, 16–19 мая 2007. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 22.
8. Барановский, А. Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. А. Кондрашина. – Санкт-Петербург : Питер, 2000. – 224 с.

9. Барышникова, Н. Антибиотики и пробиотики: обеспечение эффективности и безопасности / Н. Барышникова, Л. Белоусова // Врач. – 2012. – № 1. – С. 26–28.
10. Белобородов, Н. В. Метаболиты анаэробных бактерий (летучие жирные кислоты) и реактивность макроорганизма [Электронный ресурс] / Н. В. Белобородов. – Электрон. дан. // Режим доступа : <http://nature.web.ru/db/msg.html?mid=1183140&uri=index.html>
11. Бельмер, С. В. Антибиотик-ассоциированный дисбактериоз кишечника // Рос. мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 3. – С. 148–151.
12. Блинкова, Л. П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выделения // Журн. микробиологии, иммунологии и эпидемиологии. – 2003. – № 3. – С. 109–113.
13. Блинкова, Л.П. Бактериоцины – антибактериальные биологически активные вещества пробиотических клинических штаммов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология–2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 9–10 нояб. 2010 г. Москва, 2010. – С. 25.
14. Бондаренко, В. М. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве основы препаратов пробиотиков / В. М. Бондаренко, Э. И. Рубакова, В. А. Лаврова // Журн. микробиологии. – 1998. – № 5. – С. 107–112.
15. Бондаренко, В. М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 2. – С. 28–36.
16. Бондаренко, В. М. Молекулярно-клеточные механизмы терапевтического действия пробиотических препаратов // Фарматека. – 2010. – № 2. – С. 26–32.
17. Бондаренко, В. М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов. / В. М. Бондаренко, Н. М. Грачева // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56–63.
18. Бондаренко, В. М. Стабилизирующее действие пробиотика Хилак форте на нормальную микрофлору кишечника [Электронный ресурс] / В. М. Бондаренко. – Электрон. дан. – Режим доступа : <http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/5869>.

19. Буланова, И. А. Обоснование применения лактосодержащих пробиотиков при острых водянистых диареях у детей раннего возраста : автореф. дис. ...канд.мед.наук / И. А. Буланова. – Архангельск, 2008. – 24 с.
20. Бухарин О.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека / О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, Е.В. Иванова. – Екатеринбург : УрО РАН, 2014. – 212 с.
21. Бухарин, О. В. Межбактериальные взаимодействия / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвянцев, Л. М. Хуснутдинова // Журн. микробиологии, иммунологии и эпидемиологии. – 2003. – № 4. – С. 3–8.
22. Бухарин О.В. Микробиоценоз / О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова. - Екатеринбург : УрО РАН, 2014. – 260 с.
23. Вахитов, Т. Я. Регуляторные функции экзометаболитов бактерий / Т. Я. Вахитов, Л. Н. Петров // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. - С. 483–488.
24. Видовая характеристика и факторы персистенции бифидофлоры кишечника в норме и при дисбиозах / Е. В. Иванова [и др.] // Журн. микробиологии. – 2009. – № 2. – С. 89–93.
25. Воробьев, А. А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции / А. А. Воробьев, Е. А. Лыкова // Журн. микробиологии. – 1999. – № 6. – С. 102–105.
26. Габриэлян, Н. И. Применение пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков в хирургии / Н. И. Габриэлян, Е. М. Горская // Вестн. трансплантологии и искусств. органов. – 2008. – № 1. – С. 59–64.
27. Габриэлян, Р. И. Функции микрофлоры желудочно-кишечного тракта и последствия ее нарушения после хирургических вмешательств / Р. И. Габриэлян, Е. М. Горская, Н. Д. Снегова // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – Т. 45, № 9. – С. 24–29.
28. Гисматов Р. Х. Пробиотики и иммуномодуляторы при комплексной терапии социально значимых инфекций в пенитенциарной системе : автореф. дис. ... д-ра. мед. наук / Р. Х. Гисматов. – Уфа, 2012. – 46 с.
29. Грачева, Н. М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника / Н. М. Грачева, В. М. Бондаренко // Инфекц. болезни. –

2004. – Т. 2, № 2. – С. 53–58.

30. Грачова, Н. М. Метаболитные антибиотики: перспективы применения в клинике / Н. М. Грачова, О. С. Партин // Фарматека. – 2007. – № 20. – С. 36–39.

31. Григорьев, П. Я. Нарушение нормального состава кишечной микрофлоры, клиническое значение и вопросы терапии : метод. пособие / П. Я. Григорьев, Э. П. Яковенко. – Москва, 2000. – 15 с.

32. Гришель, А. И. Пробиотики и их роль в современной медицине / А. И. Гришель, Е. П. Кишкурно // Вестн. фармации. – 2009. – № 1 (43). – С. 1–4.

33. Димова, М. И. Бактериоциногенные и пробиотические свойства штамма *Lactobacillus plantarum* УКМ В-2705 / М. И. Димова, Н. К. Коваленко // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания: фундаментальные и клинические аспекты : материалы 9 Междунар. Славяно-Балт. науч. форума «Санкт-Петербург ГАСТРО-2007», Санкт-Петербург, 16–19 мая 2007. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 38.

34. Евлашкина, В. Ф. Специфическая активность бифидосодержащих моно- и комплексных биопрепаратов и усовершенствование их метода контроля : автореф. дис. ... канд. биол. наук / В. Ф. Евлашкина. – Москва, 2009. – 28 с.

35. Егоров, Н. С. Бактериоцины. Образование, свойства, применение / Н. С. Егоров, И. П. Баранова // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 6. – С. 33–40.

36. Ермоленко, Е. И. Антимикробное действие лактобацилл / Е. И. Ермоленко, О. В. Рыбальченко // Медицина – XXI век. – 2007. – № 5. – С. 41–49.

37. Завьялова, А. В. Микробиоценоз желудка и коррекция его отклонений у детей раннего возраста с функциональными и воспалительными заболеваниями верхних отделов пищеварительного тракта : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. В. Завьялова. – Иваново, 2008. – 20 с.

38. Зайков, С. В. Нарушения микробиоценоза кишечника: всегда ли необходимы пробиотики? // Рационал. фармакотерапия – 2008. – № 2 (07). – С. 1–6.

39. Зорина, В. В. Влияние бактерий рода *Lactobacillus* на миграционную активность макрофагов / В. В. Зорина, Т. Н. Николаева, О. В. Шаповалова // Журн. микробиологии. – 2006. – № 6. – С. 40–44.

40. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок / В.А. Бехало [и др.] // Журн. микробиологии. – 2010. – № 4. – С. 97–105.
41. Исаева, Г. Ш. Резистентность *H. Pylori* к антибактериальным препаратам и методы ее определения // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2010. – Т. 12, № 1. – С. 57–66.
42. Калмыкова, А. И. Пробиотики: терапия и профилактика заболеваний. Укрепление здоровья / А. И. Калмыкова. – Новосибирск : НПФ «Био-Веста», 2001. – 208 с
43. Киселева, Е. С. Иммонутриенты в детском питании с позиций доказательной медицины / Педиатр. фармакология. – 2008. – Т. 5, № 4. – С. 104–111.
44. Классификация отечественных пробиотических культур рода *Lactobacillus* / С. Г. Ботина [и др.] // Журн. микробиологии. – 2010. – № 6. – С. 3–7.
45. Клинико-микробиологическая эффективность применения пробиотика Флорин форте у детей с респираторной патологией / Е. Е. Целипанова [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология–2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 9–10 нояб. 2010 г. Москва, 2010. – С. 118.
46. Конев, Ю. В. Болезни кишечника. Дисбиозы и их коррекция // *Consilium medicum*. – 2005. – Т. 7, № 6. – С. 432–437.
47. Конев, Ю. В. Дисбиозы и их коррекция // *Consilium medicum*. – 2005. – Т. 7, № 6. – С. 432–437.
48. Копанев, Ю. А. Применение Хилак форте для коррекции микробиологических нарушений и функциональных расстройств у детей и взрослых [Электронный ресурс] / Ю. А. Копанев. – Электрон. дан. – Режим доступа : http://www.t-patient.ru/archive/tp10-2007/tp10-2007_350.html.
49. Корниенко, Е. А. Современные принципы выбора пробиотиков // Дет. инфекции. – 2007. – № 3. – С. 64–69.
50. Кульчицкая, М. А. Синбиотик «ЛВ-Ламинария» / М. А. Кульчицкая, М. А.

- Моисеева, Ю. И. Гришина // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания: фундаментальные и клинические аспекты : материалы 13 Междунар. Славяно-Балт. науч. форума «Санкт-Петербург ГАСТРО-2011», 18–20 мая 2011 года, Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – С. М48.
51. Кульчитская, М. А. Синбиотики «Альгилак» и «Альгибиф» / Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания: фундаментальные и клинические аспекты : материалы 13 Междунар. Славяно-Балт. науч. форума «Санкт-Петербург ГАСТРО-2011», 18–20 мая 2011 года, Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2011. – С. М48.
52. Лактофлора и колонизационная резистентность / А. А. Ленцнер [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 1987. – №. 3. – С. 173–179.
53. Лоранская, И. Д. Функциональный анализ микробиоценоза желудочно–кишечного тракта / И. Д. Лоранская, О. А. Лаврентьева // Рос. мед. журн. – 2011. – Т. 19, № 17. – С. 1057–1061.
54. Мазанкова, Л. Н. Микроэкология кишечника у детей в норме и при патологии / Л. Н. Мазанкова, А. М. Запруднов // Рос. мед. вести. – 1996. – № 1. – С. 34–43.
55. Межвидовое общение бактерий и образование смешанной (полимикробной) биоплёнки / А. Н. Маянский [и др.] // Журн. микробиол. – 2012. – № 1. – С. 93–101.
56. Метаболиты *Bacillus subtilis* как новые перспективные пробиотические препараты / М. Ю. Волков [и др.] // Журн. микробиологии. – 2007. – № 2. – С. 75–80.
57. Методические указания 1.2.2634-10 Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза. – Москва : Федер. центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 58 с.
58. Митрохин, С. Д. Дисбактериоз: современный взгляд на проблему // Инфекции и антимикроб. терапия. – 2000. – № 5. – С. 15–17.
59. Михайлова, Е. С. Микробиоценозы эзофагогастродуоденальной зоны у больных с патологией желчевыводящих путей : автореф. дис. ... канд. мед. наук /

Е. С. Михайлова. – Москва, 2009. – 24 с.

60. Молекулярные основы продукции и действия бактериоцинов / Л. П. Блинкова [и др.] // Журн. микробиологии. – 2007. – № 2. – С. 97–104.

61. Мухина, Ю. Г. Иммунная система и микрофлора кишечника у детей. Обоснование функционального питания / Ю. Г. Мухина, М. И. Дубровская, Л. И. Кафарская // Фарматека. – 2006. – № 2. – С. 22–27.

62. Нетребенко, О. К. Пробиотики и пребиотики в питании детей грудного возраста // Педиатрия. – 2007. – Т. 86, № 1. – С. 80–87.

63. Николаева, С. В. Особенности лечения острых кишечных инфекций и дисбактериоза кишечника кандидозной этиологии у детей : автореф дис. ... канд.мед. наук / С. В. Николаева. – Москва, 2009. – 20 с.

64. Николаева, Т. Н. Влияние бактерий рода *Lactobacillus* на цитотоксическую активность спленоцитов экспериментальных животных / Журн. микробиологии. – 2007. – № 3. – С. 53–57.

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

66. Новикова, М. В. Биосинтез микроцина С и механизмы устойчивости клеток к антибиотикам : автореф. дис. ... канд. биол. наук / М. В. Новикова. – Москва, 2009. – 18 с.

67. Панин, А. Н. Иммунология и кишечная микрофлора / А. Н. Панин, Н. И. Малик, Е. В. Малик. – Москва, 1998. – 47 с

68. Пантелеева, А. А. Гены продукции микроцина *Escherichia coli* S5/98, их экспрессия и влияние на антагонистические свойства рекомбинантных штаммов : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. А. Пантелеева. – Боровск, 2006. – 25 с.

69. Парфенов, А. И. Дисбактериоз кишечника: новые подходы к диагностике и лечению / А. И. Парфенов, Г. А. Осипов, П. О. Богомолов // Consilium medicum. – 2001. – Т. 3, № 6. – С. 270–272.

70. Пастухова, В. А. Эффективность Хилак форте при коррекции микрoэкологических нарушений в кишечнике у детей с atopическими

дерматитами / В. А. Пастухова, О. В. Зайцева, М. Д. Ардатская // Фарматека. – 2007. – № 6. – С. 78–82.

71. Пат. 2224018 Российская Федерация. Способ получения биологического стимулятора / В. А. Несчисляев, Л. П. Чистохина ; Федер. гос. унит. предприятие «Научно-производственное Объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген». – № 2001131538 ; заявл. 21.11.01 ; опубл. 20.02.04 ; приор. 21.11.2001. (Россия). – 10 с.

72. Патент 2090612 Российская Федерация, С 12 N 1/38. Стимулятор роста бактериальной культуры / Т. Я. Вахитов, Л. Н. Петров, О. Ю. Яшина. – 2090612. – Заявл. 17.02.93 ; опубл. 20.09.97, Бюл. №. 26.

73. Поиск стимуляторов для восстановления некультивируемых форм микроорганизмов / Ю. Д. Пахомов, Л. П. Блинкова, Т. П. Шмыгалёва // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология–2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 9–10 нояб. 2010 г. – Москва, 2010. – С. 93.

74. Пospelова, В.В. Биологическая характеристика некоторых производственных и свежесыводенных штаммов лактобацилл / В.В. Пospelова, М.А. Шабанская, Н.В. Морозова // Мед. аспекты микр. экологии. - 1992. - Вып. 6. - С. 54-57.

75. Похиленко, В.Д. Бактериоцины: их биологическая роль и тенденции применения / В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин // Электронный научный журнал «Исследовано в России» - С. 164-198 - <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>

76. Применение лекарственного препарата Хилак при лечении поражений кишечника, вызванных лучевой терапией / Н. Г. Семикоз [и др.] // Аптека. – 2000. – № 39 (260). – С. 4–5.

77. Применение пребиотика Хилак-форте в комплексном лечении больных ОКИ и хроническими заболеваниями ЖКТ у взрослых / И. Т. Щербаков [и др.] // Новые лекарств. препараты. – 2003. – № 7. – С. 51–59.

78. Применение пребиотиков для профилактики и лечения нарушений микрофлоры: у детей : учеб.-метод. пособие для мед.и фармац. ВУЗов / С. В. Бельмер. – Москва, 2006. – С. 24
79. Пробиотики в терапии постинфекционного синдрома раздраженного кишечника / В. И. Симаненков [и др.] // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания: фундаментальные и клинические аспекты : материалы 11 Междунар. Славяно-Балт. науч. форума «Санкт-Петербург ГАСТРО–2009». – Санкт-Петербург, 2009. – С. 23–28.
80. Пробиотики и механизмы их лечебного действия / В. М. Бондаренко [и др.] // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2004. – № 3. – С. 83–87.
81. Регистр лекарственных средств России РЛС Доктор: Гастроэнтерология и гепатология. — 16,й вып. /Под ред. Г.Л. Вышковского.— М.: ЛИБРОФАРМ,2012.— 512 с.
82. Роль галактозоспецифического рецептора – лектина в бактерицидной активности гемолизина *Vibrio cholerae* НЕ O1/O139 / Н. Р. Телесманич [и др.] // Журн. микробиологии. – 2010. – № 1. – С. 10–14.
83. Салливан, А. Место пробиотиков в терапии инфекций желудочно-кишечного тракта у человека / А. Салливан, К. Норд // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2003. – Т.3, № 3. – С. 275–284.
84. Семенов, А. В. Микробная регуляция антагонизма *Lactobacillus acidophilus* /А. В. Семенов, С. В. Черкасов // Материалы Всероссийской научно–практической конференции «Вакцинология–2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 9–10 нояб. 2010 г. Москва, 2010. – С. 103.
85. Семёнов, А. В. Характеристика антагонистической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. В. Семёнов. – Оренбург, 2009. – 22 с.
86. Сидоренко, С. В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С. В. Сидоренко, В. И. Тишков // Успехи биол. химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.
87. Симонова, Е. В. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья

человека / Е. В. Симонова, О. А. Пономарева // Сиб. мед. журн. – 2008. – № 8. – С. 20–25.

88. Сорокина, Ю. В. Разработка технологии и стандартизация лекарственных форм препаратов на основе метаболитов бактерий : дис. ... канд. фарм. наук / Ю. В. Сорокина. – Пермь, 2009. – 158 с.

89. Сравнительное изучение действия экзометаболитов *Escherichia coli* M-17 и фруктоолигосахаридов на рост и антагонистическую активность лактобацилл / Т. Я. Вахитов [и др.] // Журн. микробиологии, иммунологии и эпидемиологии. – 2001. – № 3. – С. 80–83.

90. Стоянова, Л. Г. Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Л. Г. Стоянова. – Москва, 2008. – 42 с.

91. Суржик, А.В. Влияние пробиотической культуры *Lactobacillus rhamnosus* GG на иммунный ответ организма // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – № 2. – С. 54–58. Андреева, И. В. Потенциальные возможности применения пробиотиков в клинической практике // Клинич микробиол. антимикроб. химиотерапия. – 2006. – Т. 8, № 8. – С. 151–172.

92. Урсова, Н. И. Базовые функции кишечной микрофлоры и формирование микробиоценоза у детей [Электронный ресурс] // Практика педиатра. – 2006. – Электрон. дан. – Режим доступа : (<http://medi.ru/doc/j01060330.htm>).

93. Ушкалова, Е. А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии // Фарматека. 2007. – № 6. – С. 16–23.

94. ФСП 42-05047224-05. Бифидумбактерин сухой. – Введ. 13.10.06. до 13.10.11. – [Б. м., б. г.]. – 15 с.

95. ФСП 42-05047298-05 Лактобактерин сухой. – Введ. 13.10.06. до 13.10.11. – [Б. м., б. г.]. – 15 с.

96. Характеристика антагонистических и кислотообразующих свойств *Lactobacillus casei* / С. А. Садуахасова [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 2. – С. 84–87.

97. Харитонов, Л. А. Формирование микрокологии кишечника и способы

коррекции микробиоценоза кишечника у детей раннего возраста // Педиатрия. – 2007. – № 2. – С. 108–113.

98. Черныш, А. Ю. Антагонистическое действие пробиотических лактобактерий в отношении патогенных стрептококков различных серологических групп : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. Ю. Черныш. – Санкт-Петербург, 2008. – 19 с.

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

100. Чистохина, Л. П. Разработка биологически активных препаратов на основе культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий / Л. П. Чистохина, В. А. Несчисляев, Г. М. Сафонова // Актуальные проблемы фармацевтической науки и образования: итоги и перспективы : материалы юбил. межвуз. науч.-практ. конф. проф.-преподават. состава, посвящ. 40-ому вып. провизоров заоч. обучения Перм. гос. фармац. акад. – Пермь, 2000. – С. 168.

101. Чупринина, Р. П. К вопросу конструирования комплексных пробиотиков / Р. П. Чупринина, В. Ф. Евлашкина, А. В. Ладыгина // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология–2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 9–10 нояб. 2010 г. – Москва, 2010. – С. 121.

102. Шевелева, М. А. Получение и стандартизация нового пробиотика «Хилафор» : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / М. А. Шевелева. – Москва, 2010. – 24 с.

103. Шендеров, Б. А. Медицинская и микробная экология и функциональное питание : в 3 т. Т. 1 : Пробиотики и функциональное питание / Б. А. Шендеров. – Москва : ГРАНТЬ, 2001. – 288 с.

104. Шендеров, Б. А. Медицинская и микробная экология и функциональное питание : в 3 т. Т. 2 : Пробиотики и функциональное питание / Б. А. Шендеров. – М. : ГРАНТЬ, 2001. – 414 с.

105. Шендеров, Б. А. Медицинская и микробная экология и функциональное питание : в 3 т. Т. 3 : Пробиотики и функциональное питание / Б. А. Шендеров. – Москва : ГРАНТЬ, 2001. – 286 с.

106. Щербаков, И. Т. Влияние препарата Хилак форте и его комбинации с антибиотиками на слизистую оболочку толстой кишки, ее комбинацию с кампилобактер и криптоспоридиями [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. – Режим доступа : <http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/6512>.

107. Эффективность применения рекомбинантного пробиотика из апатогенных бактерий рода *Bacillus* при лечении генитального герпеса / Л. М. Алимбарова [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология–2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 9–10 нояб. 2010 г. – Москва, 2010. – С. 15.

108. Янковский, Д. С. Место дисбиоза в патологии человека / Д. С. Янковский, Р. А. Моисеенко, Г. С. Дымент // *Соврем. педиатрия*. – 2010. – № 1 (29). – С. 154–167.

109. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complemetary action of two peptides. / J. Nissen-Meyer [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1992 – Vol. 174, № 17 – P. 5686–5692.

110. Cheigh, C. I. Nisin biosynthesis and its properties/ C. I. Cheigh, Y. R. Pyun // *Biotechnol. Lett.* – 2005. – № 27. – P. 1641–1648.

111. David, L. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides / L. David, M. Peter // *Physiological Reviews*. – 2001. – Vol. 81, № 3. – P. 1031–1064.

112. Diep, D. B. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11 / D. B. Diep, L. S. Havarstein, I. F. Nes // *Mol. Microbiol.* – 1995. – Vol. 18. – P. 631–639.

113. Doeschel, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives // *Food Thechnol.* – 1989. – Vol. 43. – P. 164–167.

114. Dykes, G. A. Bacteriocins: ecological and evolutionary significanse // *Trends Ecol Evol.* – 1995 – Vol. 10, № 5 – P. 186–189.

115. Gillor, O. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials / O. Gillor, B. C. Kirkup, M. A. Riley // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2004. – № 54. – P. 129–146.

116. Henningsson, A. Short-chain fatty acid formation at fermentation of indigestible

carbohydrates / A. Henningsson, I. Bjiirck, M. Nyman // Scandinavian Journal of Nutrition. – 2001. – Vol. 45. – P. 165–168.

117. Hijova, E. Short chain fatty acids and colonic health / E. Hijova, A. Chmelarova // Bratisl. Lek Listy. – 2007. – Vol. 108, № 8. – P. 354–358

118. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri* / T. C. Chung, [et al.] // Microb. Ecol. Health and Disease. – 1989. – Vol. 2. – P. 137–144.

119. Isolation and Characterization of Bacteriocin Producing *Lactobacillus* sp. from Traditional Fermented Foods / S. Jagadeeswari [at. el.] // EJEAFChe. – 2010. – Vol. 9, № 3. – P. 575–581.

120. Isolation, identification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus lactis* and its antimicrobial and cytotoxic properties / G. Rajaram [et al.] // African Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2010. – Vol. 4, № 12. – P. 895–902.

121. Kavitha, C. Antibiosis of bacteriocins with domestic lactobacilli isolated from prepared curd / C. Kavitha, R. J. Predeepa // Emir. J. Food Agric. – 2010. – Vol. 22, № 5. – P. 398–400.

122. Kleerebezen, M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis // Peptides. – 2004. – № 25. – P. 1405–1414.

123. Macfarlane, S. Regulation of short-chain fatty acid production / S. Macfarlane, George T. Macfarlane // Proceedings of the Nutrition Society. – 2003. – № 62. – P. 67–72.

124. Malini, M. Detection of heat stable bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus* NCIM5426 by liquid chromatography/mass spectrometry / M. Malini, S. Janakiraman // Indian Journal of Science and Technology. – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 2325–2332.

125. Nisin stimulates oxygen consumption by *S.aureus* and *E.coli*. / M. A. Carneiro [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 1966 – Vol. 62, № 5 – P. 1831–1834.

126. Nowrooz, J. Study of *Lactobacillus* as Probiotic Bacteria / J. Nowroozi, M. Mirzaii, M. Norouzi // Iranian. J. Publ. Health. – 2004. – Vol. 33, № 2. – P. 1–7.

127. Probiotic properties of vaginal lactic bacteria selected for harmonization of microenvironment of reproductive apparatus / E. Styková [et.al.] // JMBFS. – 2012. – 2 (1). – P. 359-405

128. Production of plantaricin by *Lactobacillus plantarum* SR18 / Wagih El-Shouny, Amal [et. al.] // JMBFS. – 2012. – № 1 (6). – P. 1488–1504.
129. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. / P. R. Marteau [et al.] // Am J Clin Nutr. – 2001. – № 73. – P. 430S–436S.
130. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides / J. Nissen-Meyer [et al.] // J. Gen. Microbiol. – 1993. – Vol. 139, № 9. – P. 1973–1978.
131. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids / Marco A. R. Vinolo [et. al.] // Nutrients. – 2011. – № 3. – P. 858–876.
132. Sakata, T. Influence of Short Chain Fatty Acid on the Epithelial Cell Division of Digestive Tract / T. Sacata, T. Yajima // Quarterly Journal of Experimental Physiology. – 1984. – № 69. – P. 639–648.
133. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. / R. P. Ross [et al.] // International Dairy Journal. – 2010. – № 20. – P. 269–276.
134. Tagg, J. R. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria / J. R. Tagg, A. S. Dajani, L. W. Wannamaker // Bacteriol. Rev. – 1976. – Vol. 40, №. 3. – P. 722–756
135. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype / M. Comalada [et. al.] // Cancer Res. Clin. Oncol. – 2006. – № 132. – P.487–497.
136. Tomomi, Hata. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1 / Tomomi Hata, Tanaka Rie, Ohmomo Sadahiro // International Journal of Food Microbiology. – 2009. – № 137 (2010). – P. 94–99.
137. Usmiati, S. Selection and optimization process of bacteriocin production from *Lactobacillus* sp. / S. Usmiati, T. Marwati // Indonesian Journal of Agriculture. – 2009. – Vol. 2, №2. – P. 82–92.
138. Venema, K. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity / K. Venema, G. Venema, J. Kok // Trends Microbiol. – 1995. – Vol. 3, № 8. – P. 299–303.
139. Wagih El-Shouny. Characterization of the partially purified plantaricin SR 18 produced by *Lactobacillus plantarum* SR18 / Wagih El-Shouny, A. Abo-Kamar, S. Ragy

// JMBFS. – 2013. – № 2 (5). – P. 2301–2305.

140. <http://n-t.ru/nl/mf/mechnikov>

СОКРАЩЕНИЯ

SCFA – «*short certain fatty acid*» - короткоцепочечные жирные кислоты

АР – аппарат разделительный

БАВ – биологически активные вещества

БАД – биологически активная добавка

ВВ – вспомогательное вещество

ВПУ – волокно полое ультрафильтрационное

ВР – вспомогательные работы

ГОСТ – государственный стандарт

ГФ – Государственная фармакопея

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

И.н. – идентичный натуральному

ИАА – индекс антибактериальной активности

КЖ – культуральная жидкость

КОЕ – колонеобразующие единицы

КС – коэффициент стимуляции

КТ – контрольная точка

ЛЖК – летучие жирные кислоты

М.м – молекулярная масса

МИТ – микробный индикатор токсичности

МПА – мясо-пептонный агар

НД — нормативная документация

НОММ – номинальная отсекаемая молекулярная масса

ОФС – общая фармакопейная статья

СОИ – стандартные операционные инструкции

СФМ - спектрофотометр

СФМ - спектрофотометрия

ТО – технологическая операция

ТП – технологический процесс

УПЛ – установка волоконная лабораторная

УПМ – условно-патогенные микроорганизмы

УФ – ультрафильтрат

ФС – фармакопейная статья

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

Проекты нормативной документации

УТВЕРЖДАЮ:

Директор по качеству ФГУП
«НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России

« ____ » _____ 2013 г.

ПРОЕКТ**ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ**

По изготовлению биологически активной к ТУ 9197-_____-13
добавки к пище «Микростим-лакто»

Настоящая технологическая инструкция предусматривает изготовление биологически активной добавки к пище «Микростим-лакто» во флаконах-капельницах, предназначенной для реализации населению.

1. СЫРЬЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для изготовления биологически активной добавки (БАД) «Микростим-лакто» используют бесклеточный ультрафильтрат культуральной жидкости лактобактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3.

Для получения ультрафильтрата лактобактерий применяют:

1. штамм *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (паспорт штамма);
2. казеиново-дрожжевую питательную среду (ПР № 04862997-56-2010 «Лактобактерин сухой, лиофилизат для приема внутрь и местного применения»);
3. Калия сорбат (Е 202).
4. Ароматизатор пищевой Карамель ГОСТ Р 52177-2003.

УТВЕРЖДАЮ:

Директор по качеству ФГУП
«НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России

« ____ » _____ 2014 г.

ПРОЕКТ**ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ**

По изготовлению биологически активной к ТУ 9197-_____-14
добавки к пище «Хилабикс»

Настоящая технологическая инструкция предусматривает изготовление биологически активной добавки к пище «Микростим-лакто» во флаконах-капельницах, предназначенной для реализации населению.

2. СЫРЬЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для изготовления биологически активной добавки (БАД) «Микростим-лакто» используют бесклеточный ультрафильтрат культуральной жидкости лактобактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3.

Для получения ультрафильтрата лактобактерий применяют:

1. штамм *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (паспорт штамма);
2. штамм *Lactobacillus acidophilus* К₃Ш₂₄ (паспорт штамма);
3. штамм *Bifidobacterium bifidum* 1 (паспорт штамма);
4. казеиново-дрожжевую питательную среду (ИР № 04862997-56-2010 «Лактобактерин сухой, лиофилизат для приема внутрь и местного применения»);
5. Калия сорбат (Е 202).
6. Ароматизатор пищевой Карамель ГОСТ Р 52177-2003.

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим
препаратам «Микроген»
Министерства здравоохранения РОССИИ

(ФГУП «НПО «МИКРОГЕН» Минздравсоцразвития России)

ОКП _____ Группа _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России
_____ В.Ф. Руденко
« ____ » _____ 20__ г.

Биологически активная добавка к пище

«ХИЛАБИКС»

ПРОЕКТ Технические условия

ТУ 9197-_____-_____-14

(вводятся впервые)

Дата введения в действие
« ____ » _____ 201__ г.

СОГЛАСОВАНО

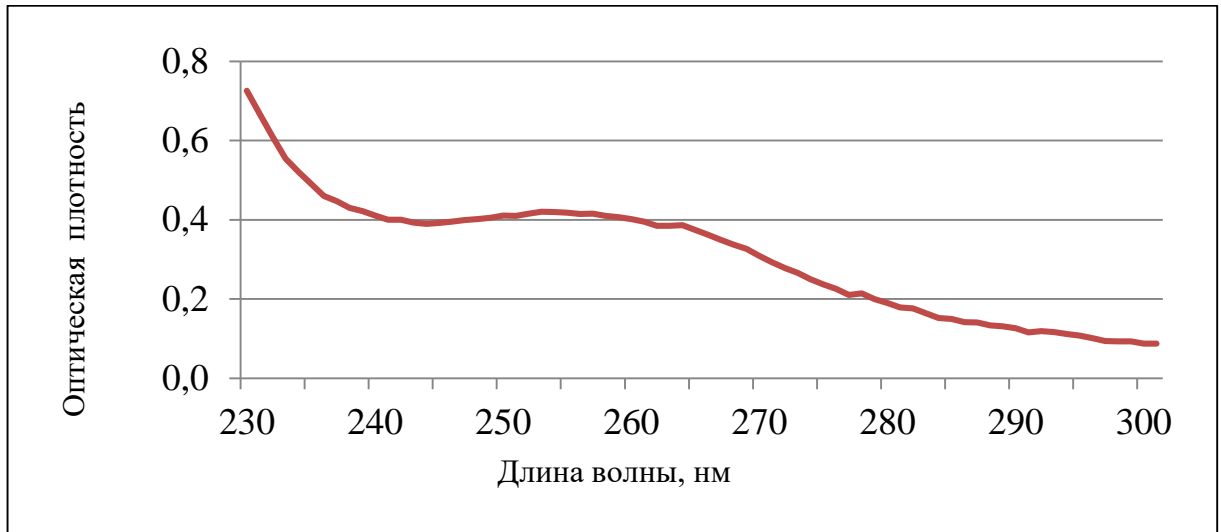
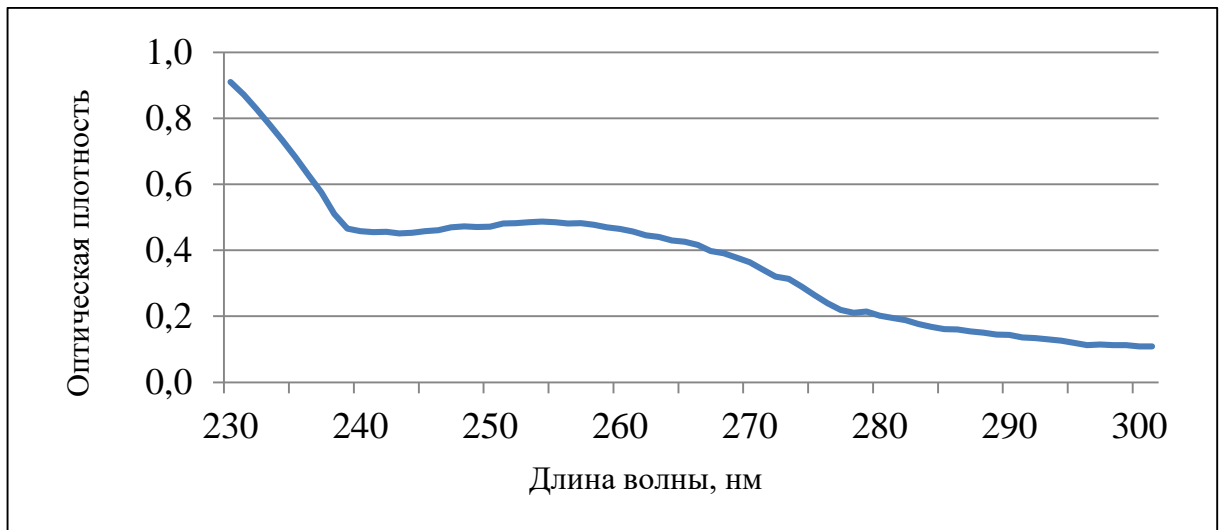
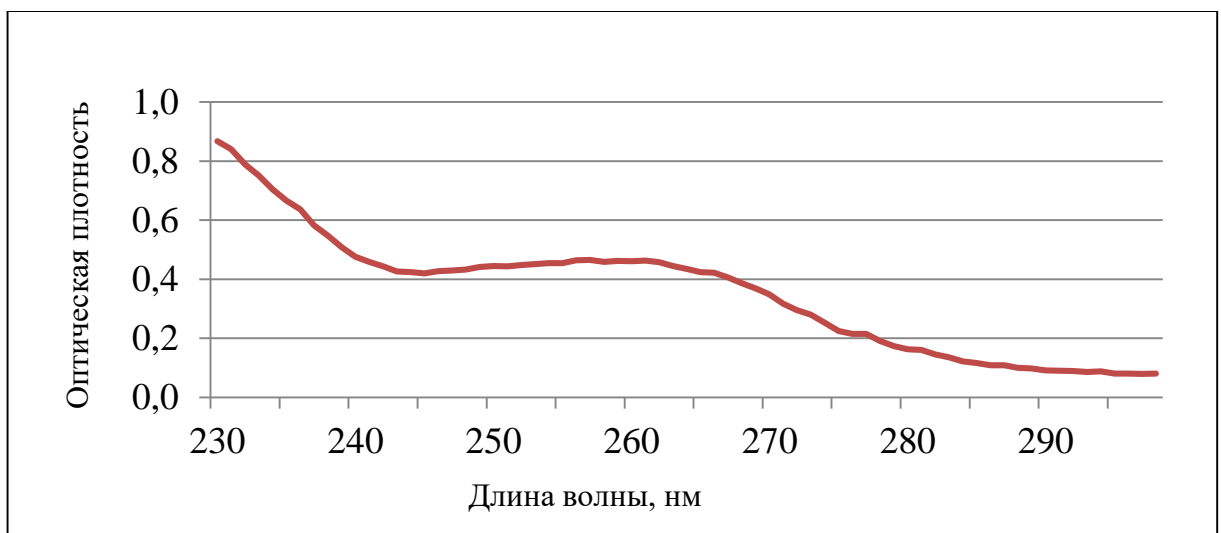
РАЗРАБОТАНО

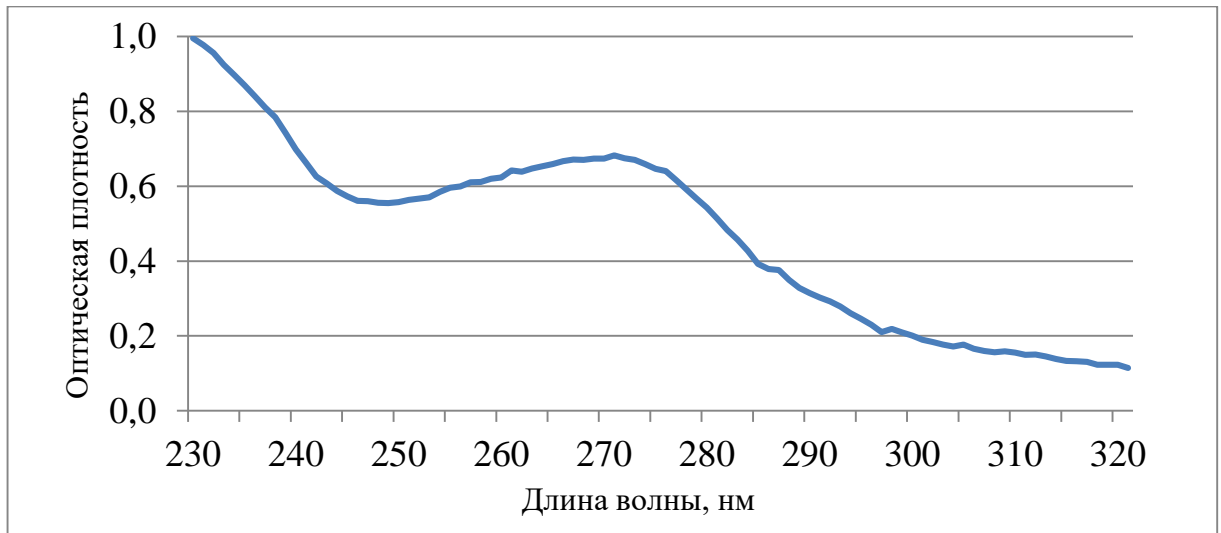
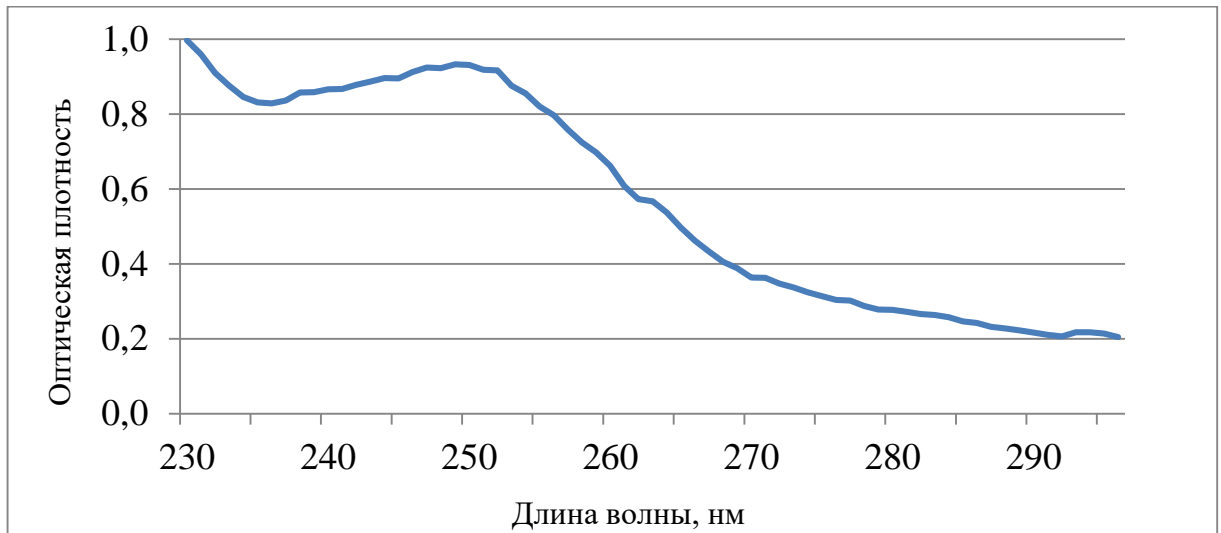
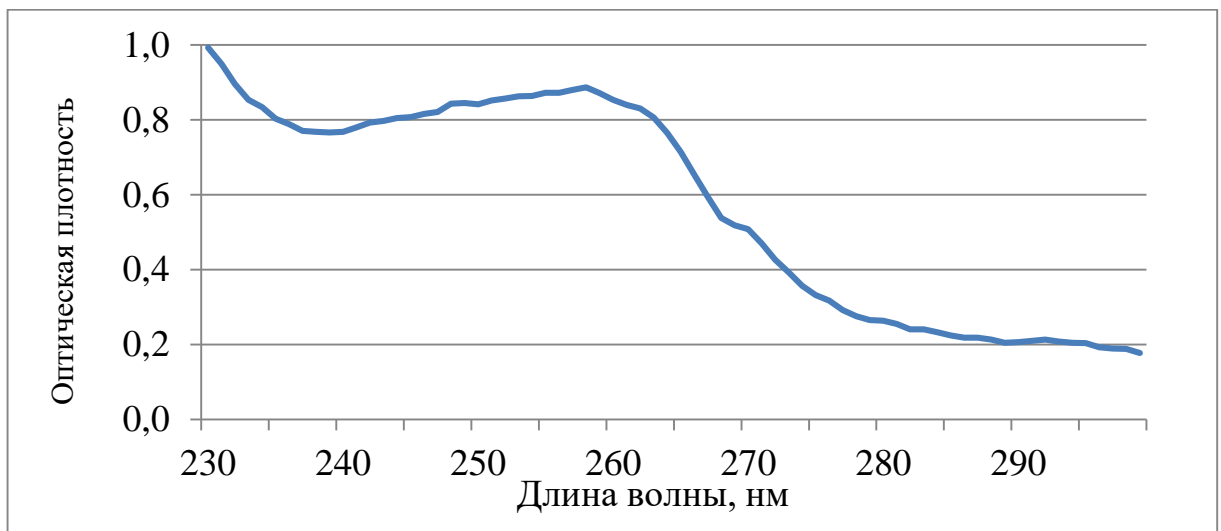
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России

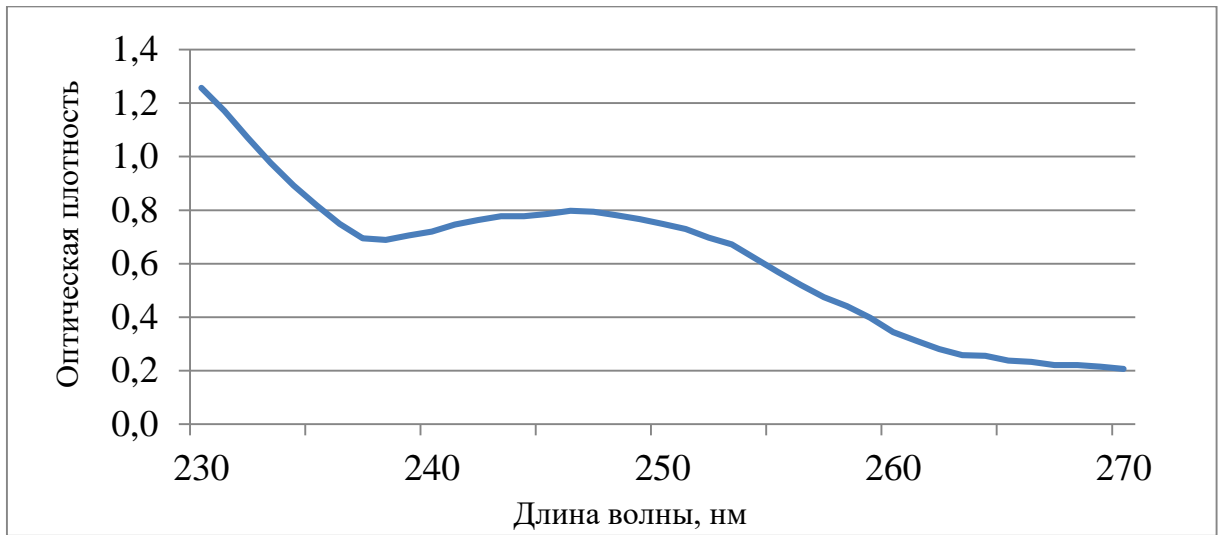
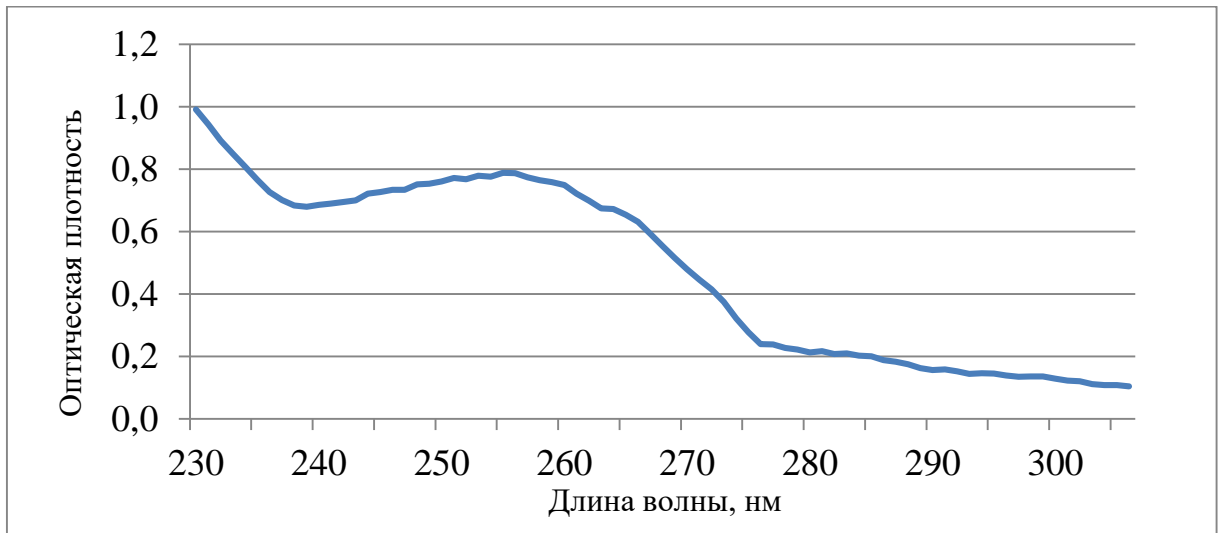
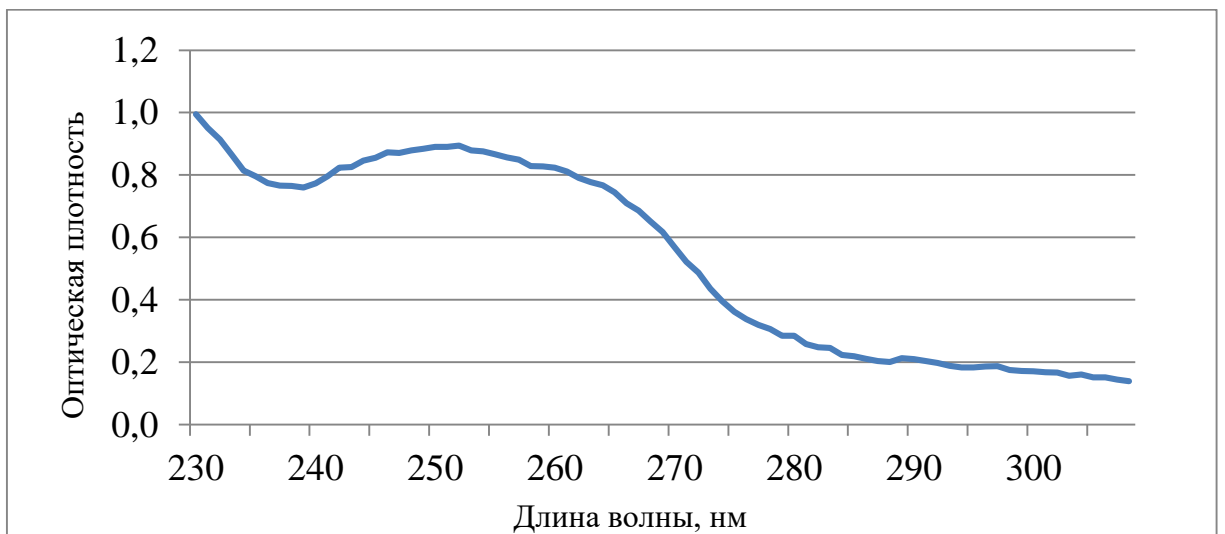
ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

**Ультрафиолетовые спектры культуральных жидкостей
пробиотических штаммов**

Рисунок 1 – Спектр УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 15 кДаРисунок 2 – Спектр УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 100 кДаРисунок 3 – Спектр УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 300 кДа

Рисунок 4 – Спектр УФ КЖ *L. acidophilus* K₃Ш₂₄ 15 кДаРисунок 5 – Спектр УФ КЖ *L. acidophilus* K₃Ш₂₄ 100 кДаРисунок 6 – Спектр УФ КЖ *L. acidophilus* K₃Ш₂₄ 300 кДа

Рисунок 7 – Спектр УФ КЖ *V. bifidum* / 15 кДаРисунок 8 – Спектр УФ КЖ *V. bifidum* / 100 кДаРисунок 9 – Спектр УФ КЖ *V. bifidum* / 300 кДа

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

**Хроматограммы ультрафильтратов культуральных жидкостей
пробиотических штаммов**

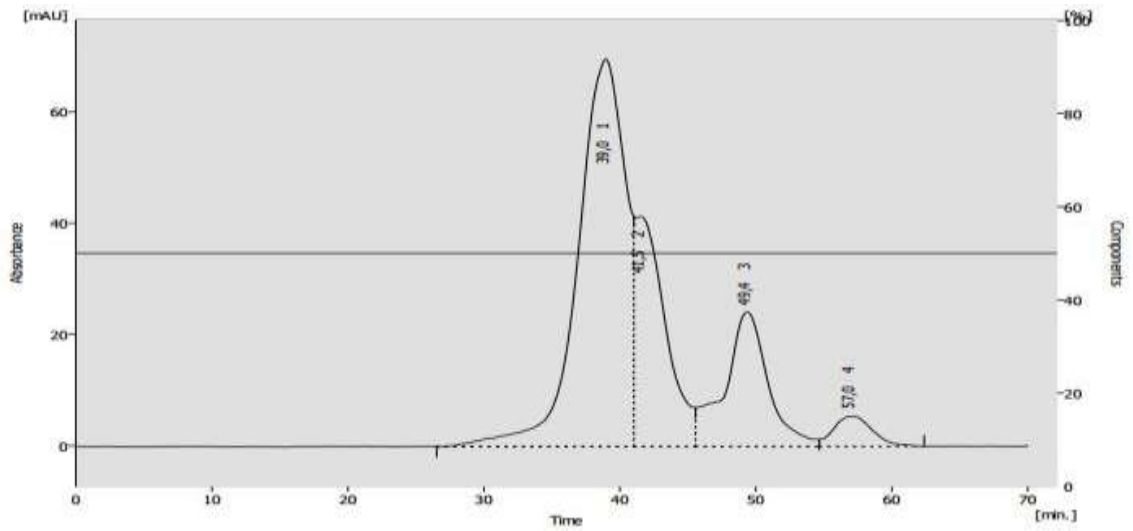


Рисунок 10 – Хроматограмма УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 15 кДа

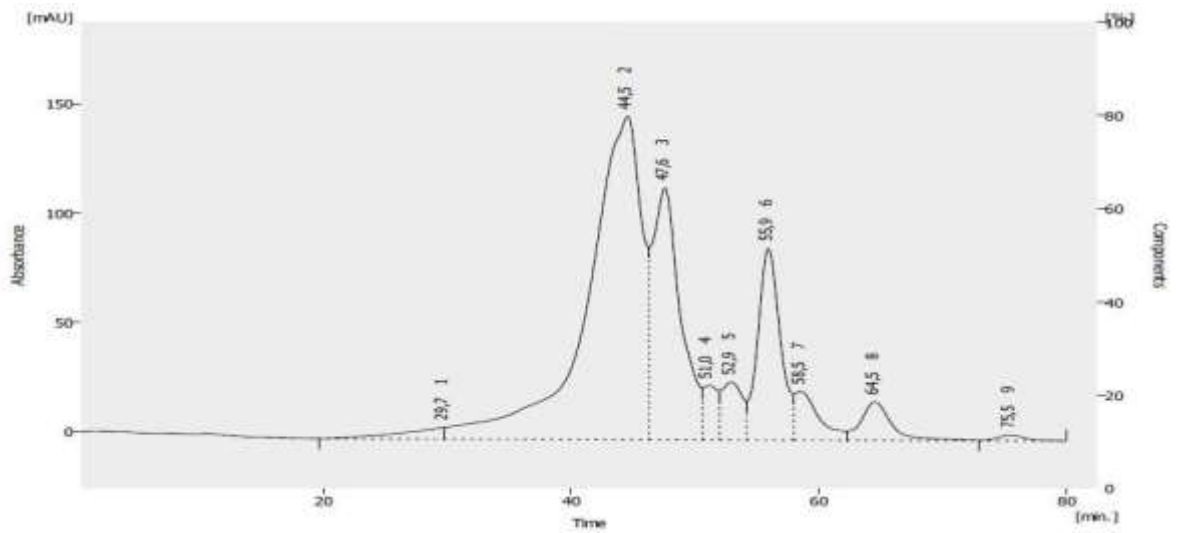


Рисунок 11 – Хроматограмма УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 100 кДа

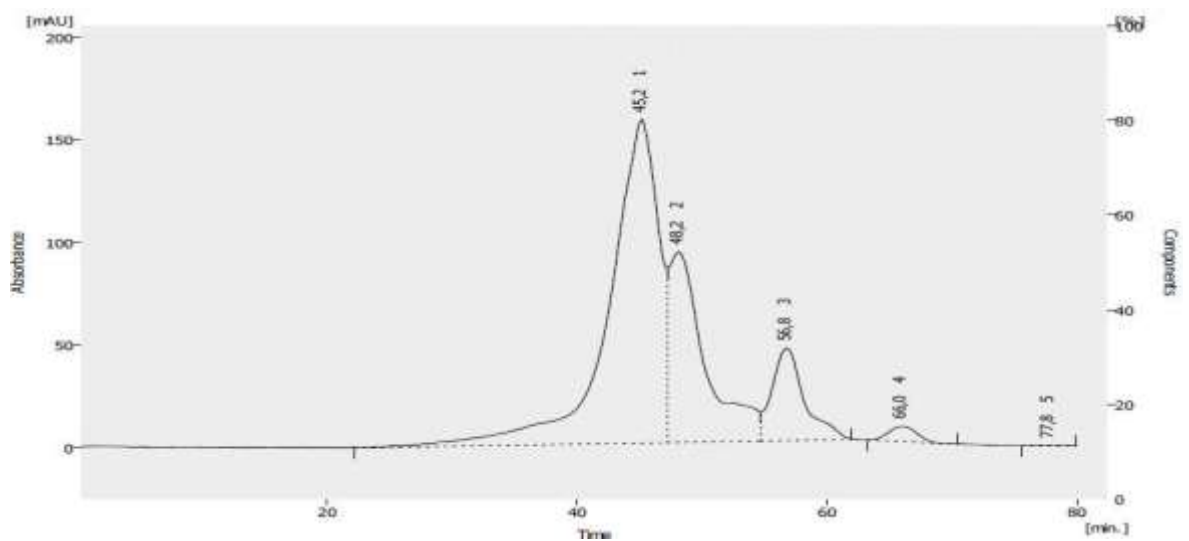


Рисунок 12 – Хроматограмма УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 300 кДа

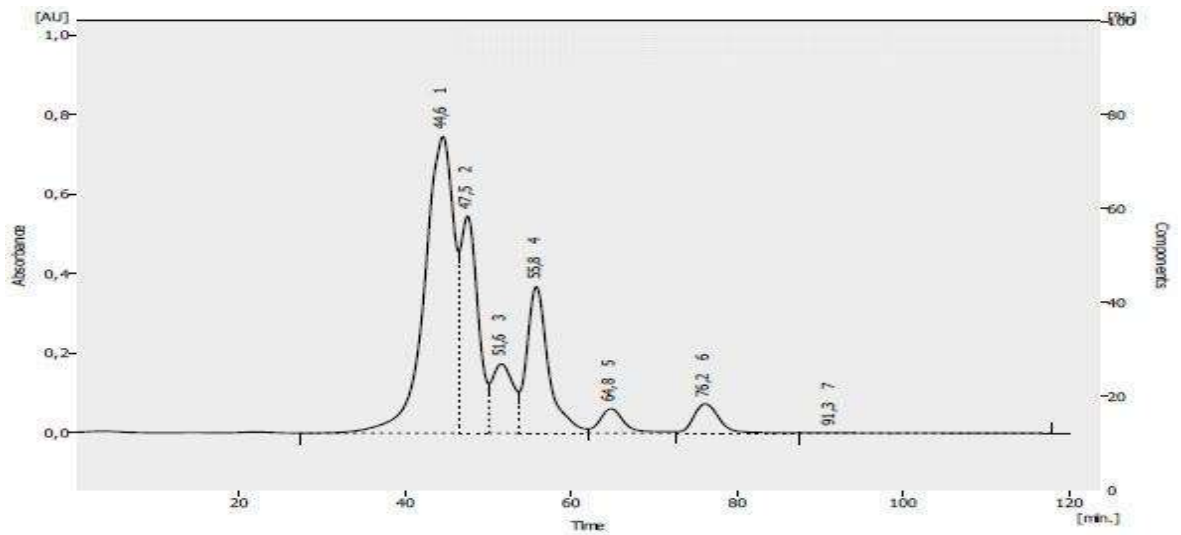


Рисунок 13 – Хроматограмма УФ КЖ В. bifidum/ 15 кДа

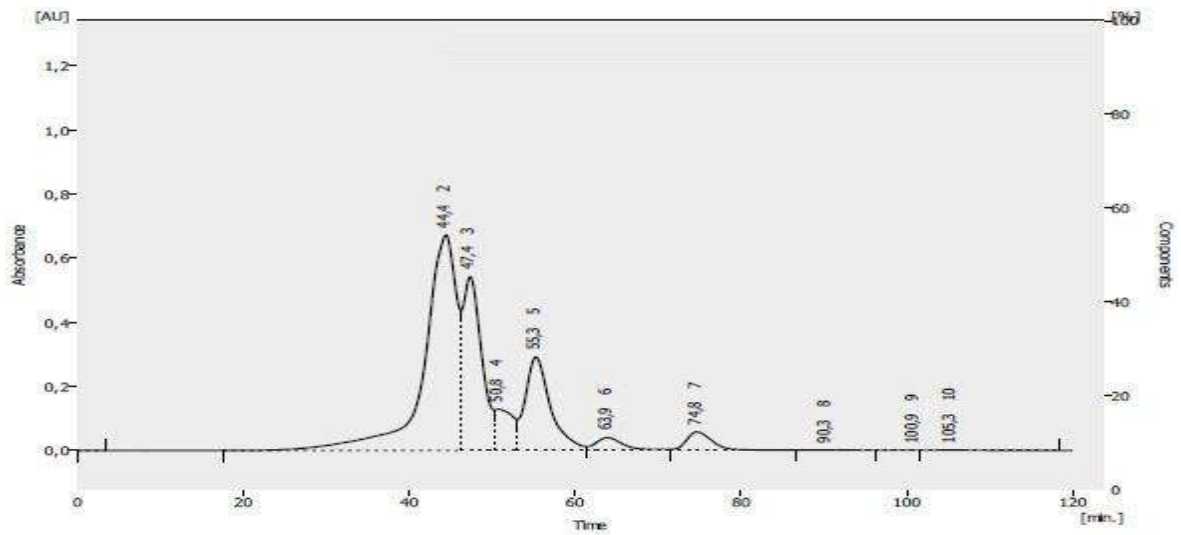


Рисунок 14 – Хроматограмма УФ КЖ В. bifidum/ 100 кДа

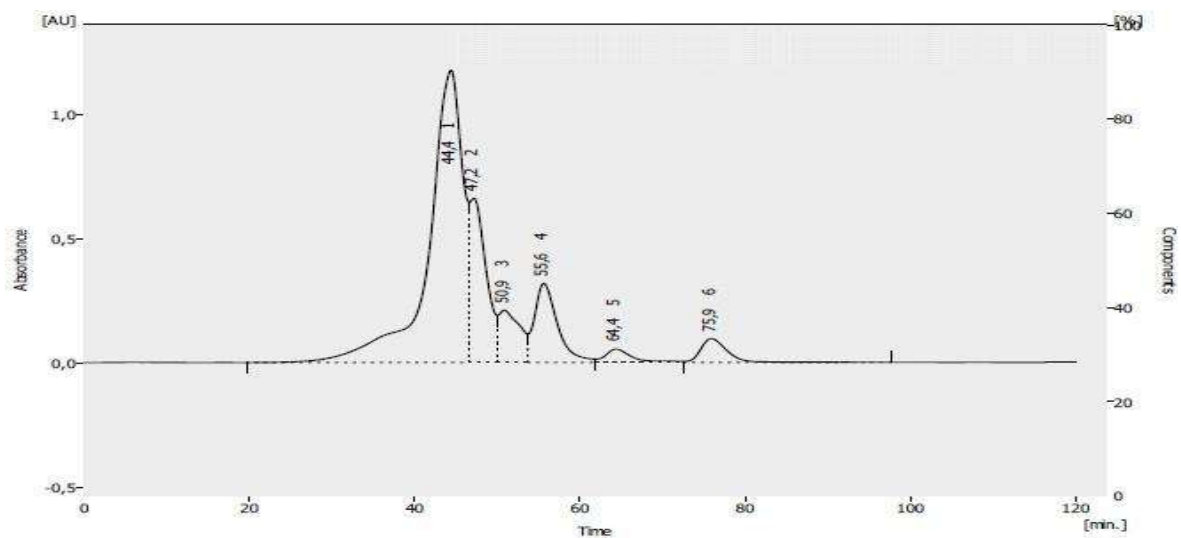


Рисунок 15 – Хроматограмма УФ КЖ В. bifidum/ 300 кДа

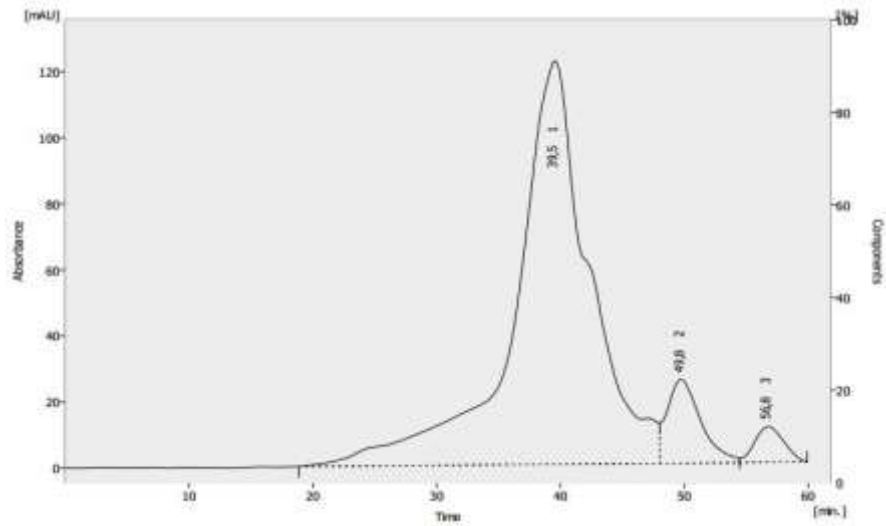


Рисунок 16 – Хроматограмма УФ КЖ *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ 15 кДа

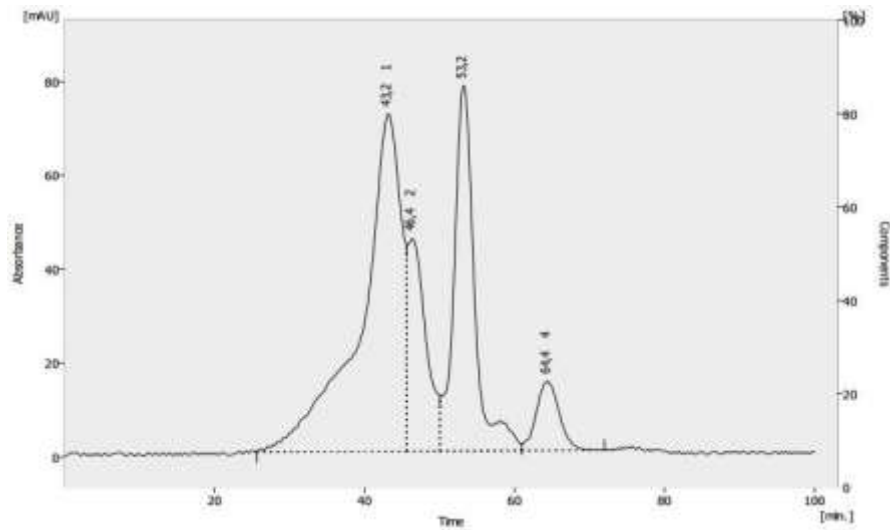


Рисунок 17 – Хроматограмма УФ КЖ *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ 100 кДа

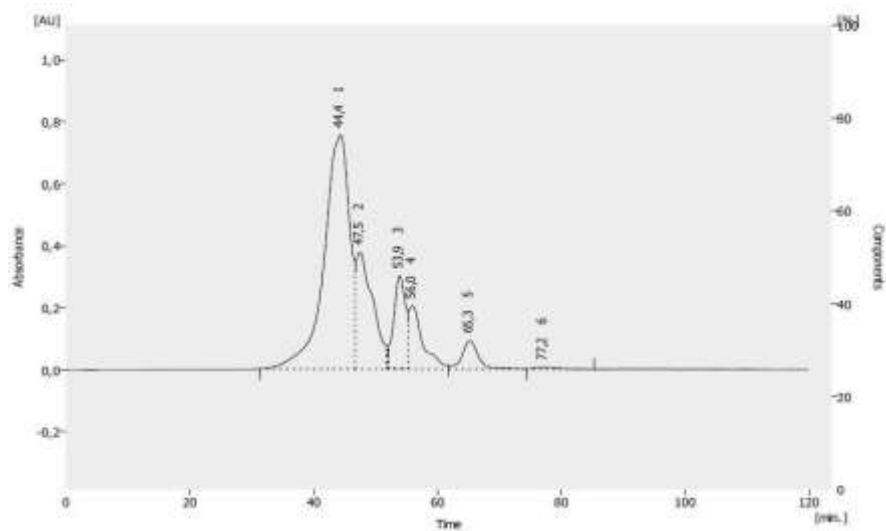


Рисунок 18 – Хроматограмма УФ КЖ *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ 300 кДа

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(обязательное)

Ультрафиолетовые спектры и хроматограммы

«Хилабикс 15» и «Хилабикс 100»

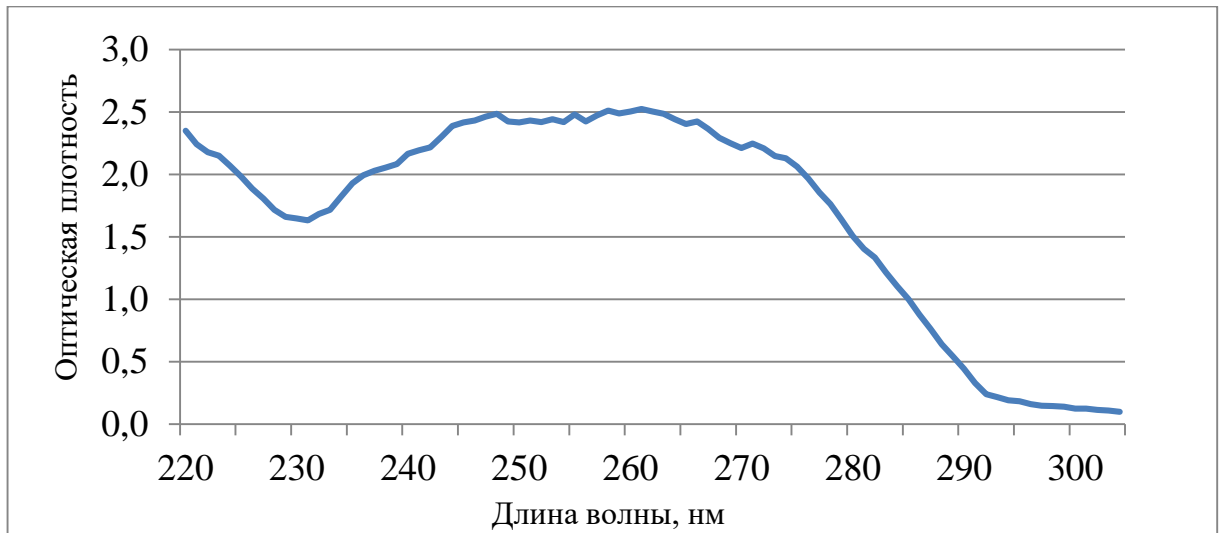


Рисунок 19 – Спектр «Хилабикс 15»

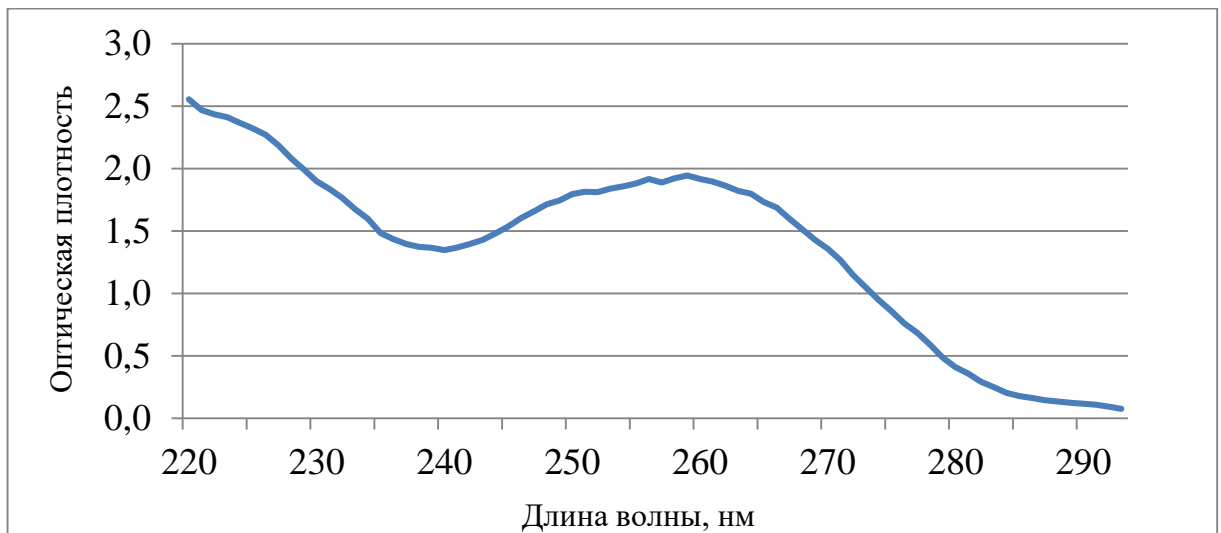


Рисунок 20 – Спектр «Хилабикс 100»

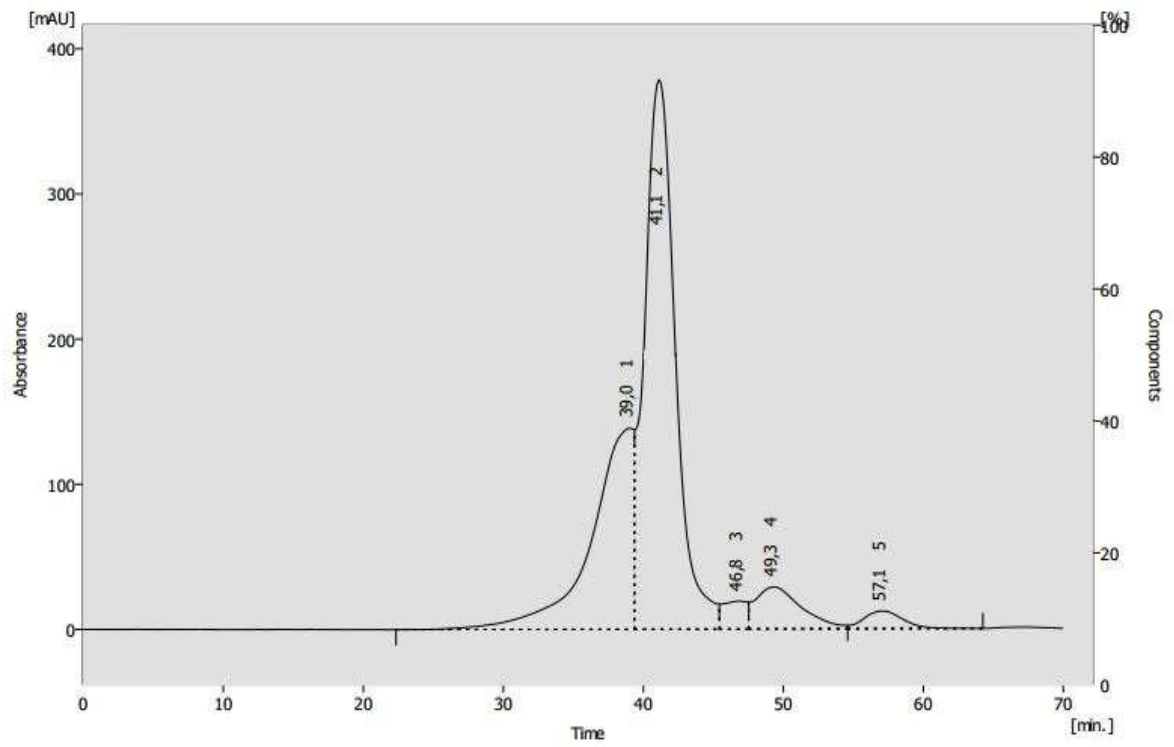


Рисунок 21 - Хроматограмма «Хилабикс 15»

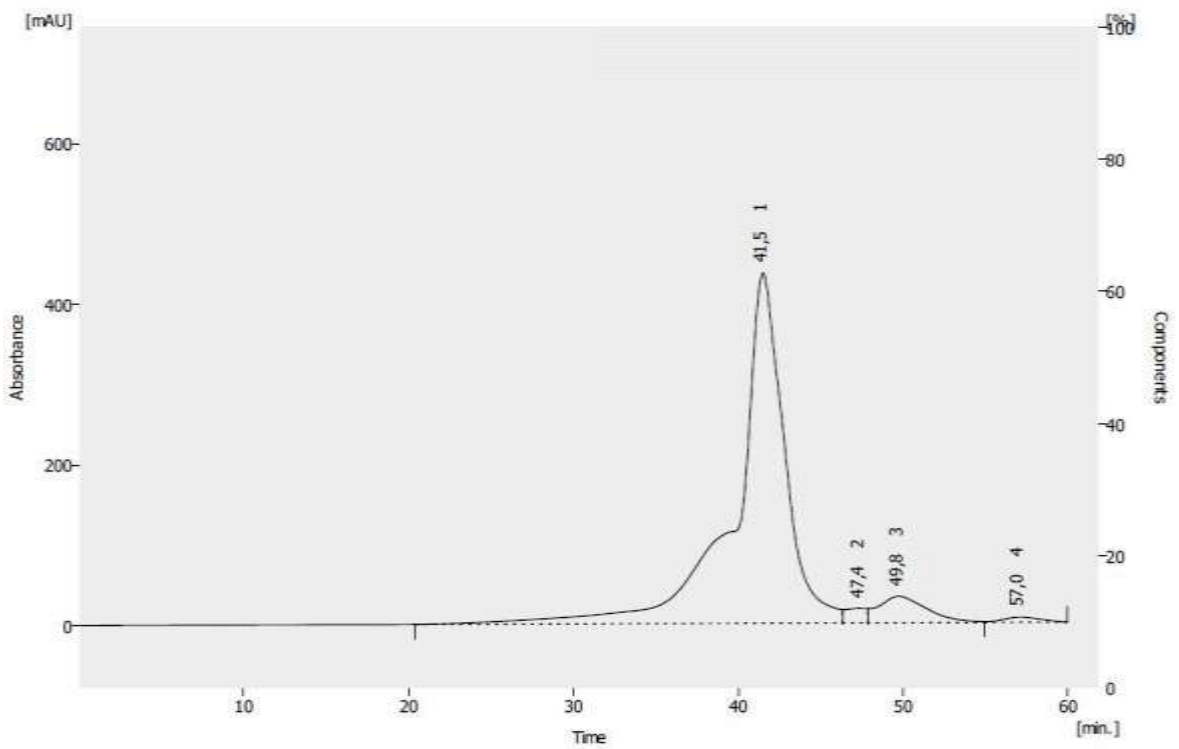


Рисунок 22 - Хроматограмма «Хилабикс 100»